AGRONOMIA LUSITANA

IMPERIAL MYCOLOGICAL
19 AUG. 1943
INSTITUTE

ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL

PORTUGAL

VOL. 3 — N.º 4

1941

AGRONOMIA LUSITANA

VOL. 3 — N.º 4
1941

Estação Agronómica Nacional
PORTUGAL

Composição e impressão das Oficinas da
Tipografia Alcobacense, Lt. - Alcobaça

DOZE ANOS DE CITOLOGIA E GENÉTICA DOS FUNGOS

POR *A. QUINTANILHA*

ÍNDICE

PÁG.

Introdução 241
Estado da questão em 1928 242
Os primeiros problemas atacados.
Estudo Genético da redução cromática 243
a) Modificações introduzidas na técnica . . . 245
b) Resultados obtidos 246
c) Interpretação pelo entrecruzamento . . . 248
Copulações ilegítimas 249
Frutificações haplóides 255
Hereditariedade dos fenómenos de nanismo 257
Estudo do «Fenómeno de Buller» 266
a) As confrontações compatíveis 269
b) As confrontações incompatíveis 275
Interpretação teórica da sexualidade nos fungos . . . 282
A genética dos himenomicetos nas suas relações com a sistemática 286
Résumé 296
Bibliografia 299

Foi em fins de Setembro de 1928 que chegámos a Berlim para aí começarmos o nosso estágio, no «Pflanzenphysiologischen Institut», sob a direcção de KNIEP.

Tínhamos lido com entusiasmo os seus notáveis trabalhos sôbre a sexualidade dos Basidiomicetos quando, em 1926, havíamos escolhido êsse assunto para tema da lição de concurso ao professorado. Em 1927, de passagem por Berlim, fomos travar conhecimento com o Mestre e visitar o seu Laboratório. Manifestámos-lhe o desejo de ir trabalhar sob a sua direcção. E como KNIEP acedêsse, com a maior gentileza, e a Faculdade nos pudesse proporcionar um estágio no estrangeiro, partimos, no verão de 1928, felicíssimos por poder emfim realizar o nosso velho sonho.

Mais de uma dúzia de anos são volvidos depois que iniciámos

os nossos trabalhos nesta direcção. Pareceu-nos interessante, nesta altura da viagem, fazer um alto a meio da estrada, deitar os olhos sôbre o caminho já percorrido e dar o balanço aos principais resultados obtidos.

ESTADO DA QUESTÃO EM 1928

Sabia-se já, por essa época, que nos Basidiomicetos se encontram, lado a lado, espécies homotálicas e hèterotálicas; que, nestas últimas, umas são bipolares, outras tètrapolares. Sabia-se ainda, graças à análise de tétradas, que numas e noutras o «sexo» é um caracter hereditário (Quadros I e II).

	A	a
	1	2
A 1	−	+
a 2	+	−

Quadro I
Espécies bipolares

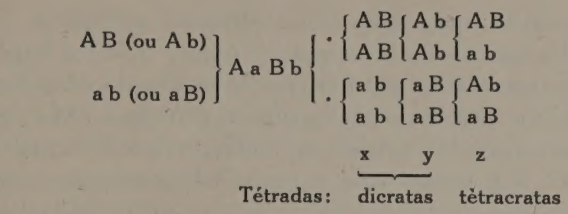
	AB	Ab	aB	ab
	1	2	3	4
A B 1	−	−	−	+
A b 2	−	−	+	−
a B 3	−	+	−	−
a b 4	+	−	−	−

Quadro II
Espécies tètrapolares

Foi o próprio KNIEP quem deu a interpretação genética dêstes resultados, atribuindo a bipolaridade sexual à existência de um par de alèlomorfos (Aa), que se juntam no momento da cariogamia e se separam de novo ao realizar-se a redução cromática; donde resulta, como conseqüência necessária, a existência, em cada tétrada, de dois esporos de um «sexo» (A) e dois do outro (a).

$$\left.\begin{matrix} A \\ a \end{matrix}\right\} Aa \left\{\begin{matrix} \cdot \left\{\begin{matrix} A \\ A \end{matrix}\right. \\ \cdot \left\{\begin{matrix} a \\ a \end{matrix}\right. \end{matrix}\right.$$

Semelhantemente explicou KNIEP a tètrapolaridade sexual pelo jogo mendeliano de dois pares de genes (Aa, Bb), localizados em dois pares de cromosomas, e produzindo assim, a cada geração, os quatro grupos «sexuais» (AB, ab, Ab, aB).



A esta interpretação mendeliana da sexualidade juntou KNIEP a sua «lei da incompatibilidade dos haplontes possuindo um factor comum»; donde, nas formas bipolares, só eram possíveis as combinações (A × a), e nas tétrapolares (AB × ab e Ab × aB).

Conhecia-se já, para certas espécies, a existência de raças geográficas, morfològicamente idênticas mas interférteis em tôdas as combinações dos seus haplontes; facto que KNIEP havia interpretado admitindo a existência, para cada par de factores mendelianos responsáveis pelo «sexo», de uma série alèlomórfica.

Por outro lado, tinha-se já conhecimento nessa altura de excepções à lei da incompatibilidade de KNIEP, sobretudo para as formas tétrapolares; excepções que se manifestavam por uma reacção positiva entre haplontes portadores de um factor comum de «sexualidade» (AB × aB, p. ex.). Os autores alemães chamavam-lhes «Durchbrechungskopulationen», que nós traduzimos, na piugada de Vandendries, por «copulações ilegítimas». Delas apenas se sabia então que eram excepções a uma lei, irregularidades mais ou menos caprichosas e a que se não havia ligado importância de maior.

Eram êstes, resumidamente, os factos essenciais então conhecidos, e estas as interpretações teóricas de KNIEP, já então quási universalmente aceites.

OS PRIMEIROS PROBLEMAS ATACADOS

Estudo genético da redução cromática

O trabalho que KNIEP nos propôs, quando começámos o nosso estágio no seu laboratório, foi o estudo genético da redução cromática nos Himenomicetos.

Sabia-se já que o único núcleo diplóide, no ciclo evolutivo dêste grupo de fungos, era o que no basídio resultava da fusão dos dois núcleos haplóides primitivos (Est. I, fig. 6); e sabia-se

por outro lado que, após duas divisões sucessivas, o núcleo diplóide do basídio dava origem a quatro núcleos haplóides, os núcleos dos respectivos esporos. A demonstração dêste facto tinha sido dada por métodos citológicos e genéticos. Mas, das duas divisões sucessivas do núcleo diplóide do basídio, qual delas é a reducional? A primeira ou a segunda? E será sempre uma delas, e sempre a mesma, a divisão reducional? Ou poderá ser, umas vezes uma, outras vezes outra? Nesta última hipótese, não haverá factores estranhos que de qualquer modo intervenham no processo modificando a percentagem de basídios com prèredução e postredução?

Êste problema tinha evidentemente um interêsse bastante geral. A opinião então mais espalhada, sobretudo entre citologistas, era que a divisão reducional devia ser a primeira. Havia porém indícios de que as coisas nem sempre se passariam assim; e, por outro lado, os próprios métodos citológicos que tinham levado a esta conclusão eram susceptíveis de outra interpretação. KNIEP era de opinião que os métodos mais seguros para a resolução do problema eram os métodos genéticos, pois que, no caso normal, sendo os quatro cromatídeos de cada tétrada cromosómica perfeitamente iguais, é muito difícil afirmar com segurança se é na primeira ou na segunda divisão que se separam os homólogos; e, por outro lado, ainda não tinha sido possível, naquela data, obter pares de cromosomas homólogos diferentes, ou pela forma, ou pelas dimensões (presença ou ausência de satélites, deficiências, translocações).

Escolheu-se como material o *Coprinus fimetarius* (Est. I, fig. 2 a 5), que se sabia, por pesquisas anteriores, ser uma espécie heterotálica tètrapolar. Esta tètrapolaridade era determinada pela existência de dois pares de factores de incompatibilidade (Aa, Bb), que se conduziam como se estivessem localizados em dois pares diferentes de cromosomas.

Esta espécie era particularmente favorável ao estudo do problema em causa. De cultura muito fácil, com esporos germinando em percentagem excepcionalmente elevada (cêrca de 100 %), e produzidos em número pràticamente infinito, com grande número de gerações por ano e, sobretudo, com a possibilidade de se poderem isolar tétradas de esporos (Est. I, fig. 7), isto é, de se poderem seguir, em culturas monospóricas e logo após a redução

cromática, os quatro cromatídeos de cada par de cromosomas homólogos.

Se a divisão reducional fôsse a primeira, só deviam encontrar-se tétradas dicratas, isto é, com dois esporos (AB) e dois outros (ab), ou dois (Ab) e dois (aB); e os dois tipos deviam encontrar-se aproximadamente em igual número, se a segregação fôsse realmente independente. Se, pelo contrário, a divisão reducional fôsse a segunda, devia haver ao lado de 50 o/o de tétradas dicratas, dos dois tipos acima expostos, 50 o/o de tétradas tètracratas (AB, ab, Ab, aB, cf. Esquema pág. 243).

a) *Modificações introduzidas na técnica*

As tétradas dos Coprinos, bem como as de muitos outros Himenomicetos que produzem esporos còrados, são relativamente fáceis de isolar no fresco, com um micromanipulador e uma agulha de vidro fina. Com cuidado, uma mão firme e muita paciência, é até possível isolá-las sem micromanipulador, com uma lupa binocular forte e uma agulha bem firme entre o polegar e o indicador. Mas o isolamento à mão é extremamente fatigante; e o trabalho feito sôbre as frutificações frescas tem de ser muito rápido, pois nos Coprinos a deliqüescência das lamelas começa logo após a maturação. A mais interessante inovação que introduzimos na técnica foi o processo de colagem das lamelas do chapéu sôbre lâminas de vidro, feito de modo que grande número de tétradas ficassem nas suas posições primitivas. Estas lamelas assim coladas deixam-se secar; e como o poder germinativo dos esporos se conserva, nesta espécie, durante anos, é relativamente fácil isolar, de um mesmo chapéu e com todo o sossêgo, tantas tétradas quantas fôrem precisas.

O isolamento dos quatro esporos de cada tétrada é relativamente fácil de conseguir à mão, em uma gôta de água e com o auxílio de uma boa lupa binocular.

Outra inovação interessante que introduzimos foi a construção de uma microforja eléctrica para a preparação das agulhas de vidro. A princípio fabricávamos as nossas agulhas como tôda a gente, com um microbico de gaz; e em Coimbra, onde nem gaz havia, com uma minúscula candeiazita de azeite. Construímos depois uma microforja eléctrica, baseada no mesmo princípio da de

DE FOMBRUNNE, mas muito mais simples, incomparàvelmente mais barata (menos da centéssima parte do custo da outra!) e fazendo exactamente o mesmo serviço (inédita).

Trata-se, na sua essência, de um fio de platina, colocado no campo do microscópio, e aquecido por uma corrente de baixa voltagem a uma temperatura que se pode fazer variar com a intensidade da corrente. O estiramento das agulhas e seu encurvamento faz-se com o micromanipulador, sob o contrôle do microscópio. Todos os outros instrumentos de microdissecção — micropipetas, microansas, etc. — se fazem brincando, na nossa forja, que teve, acima de tudo o mais, a enorme vantagem de nos custar à roda de uma centena de francos e uns dois dias de trabalho na oficina.

Com esta microforja os menos dotados de habilidade manual fabricam, com tôda a segurança, os mais delicados instrumentos de dissecção. E com poucos dias de aprendizagem podem-se isolar algumas dezenas de tétradas por dia.

b) *Resultados obtidos*

Todos os autores que antes de nós se tinham ocupado dêste assunto haviam encontrado, para o número de tétradas tètracratas, valores compreendidos entre 0 e 50 %. Os seus resultados eram pois compatíveis com uma das seguintes interpretações: Prèredução — 0 % de tètracratas; postredução — 50 % de tètracratas; prèredução em certos basídios e postredução nos outros do mesmo chapéu — percentagem de tètracratas variando entre 0 e 50.

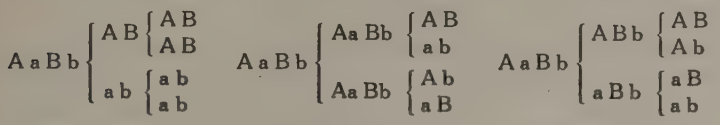
1922	KNIEP	*Aleurodiscus polygonius*	35	tétadras	0 z + 35 (x+y)	0 % z,	100 % (x+y)
1924	»	»	12	»	1 z + 11 (x+y)	8 % z,	92 % (x+y)
1924	»	»	23	»	5 z + 17 (x+y)	22 % z,	78 % (x+y)
1925	HANNA	*Coprinus fimetarius*	13	»	6 z + 7 (x+y)	46 % z,	54 % (x+y)
1926	NEWTON	»	47	»	25 z + 22 (x+y)	53 % z,	47 % (x+y)
1926	BRUNSWIK	»	93	»	37 z + 56 (x+y)	40 % x,	60 % (x+y)
1930	OORT	»	151	»	74 z + 77 (x+y)	49 % z,	61 % (x+y)
1933	QUINTANILHA	»	17	»	11 z + 6 (x+y)	65 % z,	35 % (x+y)
1933	»	»	107	»	86 z + 21 (x+y)	80 % z,	20 % (x+y)

Quadro III

(z = tètradas tétracratas; x + y = tétradas dicratas)

Os nossos resultados são os primeiros que se não acomodam com esta interpretação, pois numa das séries de 107 tétradas

obtivemos 80 % de tètracratas. Pareceu-nos pois indispensável admitir a existência de uma redução mixta em certos basídios, isto



Prèredução Postredução Redução mixta

é, uma divisão reducional para certos pares de cromosomas e equacional para os outros pares de cromosomas do mesmo núcleo diplóide.

Confrontando todos os resultados obtidos, os nossos e os dos outros, fomos levados às seguintes conclusões:

a) Os dois pares de factores de incompatibilidade segregam independentemente; deve-se admitir, pelo menos provisòriamente, que estão localizados em pares diferentes de cromosomas;

b) A redução cromática pode fazer-se por três processos diferentes: prèredução, postredução e redução mixta. No mesmo chapéu podem encontrar-se os três tipos diferentes de redução. A percentagem, extremamente variável para cada espécie, de tétradas dicratas e tètracratas é a conseqüência da proporção em que se encontram os basídios que seguem cada um dos três diferentes processos de redução. Quanto mais casos de prèredução, tanto mais tétradas dicratas; quantos mais casos de redução mixta tanto mais tétradas tètracratas;

c) A posição dos quatro cromatídeos de cada tétrada cromosómica, em relação ao equador da célula, pode, em princípio, ser qualquer. Mas na mesma espécie é provável que factores de ordem exterior influenciem esta posição, o que explicaria as largas variações, dentro da mesma espécie, da percentagem de tétradas dicratas e tètracratas.

Um outro discípulo de KNIEP, HÜTIG, trabalhando com um material mais favorável que o nosso, o género *Ustilago*, tinha chegado à conclusão que a divisão reducional tanto pode ser a primeira como a segunda; e poude, por outro lado, verificar que temperaturas elevadas favorecem a postredução, emquanto baixas temperaturas aumentam a percentagem de prèredução.

c) *Interpretação pelo entrecruzamento*

Todos êstes resultados, porém, são susceptíveis de uma outra interpretação, que não tinha ocorrido a ninguém e só muito recentemente foi apresentada, discutida e verificada experimentalmente.

Suponhamos ainda o nosso caso, dois pares de factores (Aa, Bb) localizados sôbre dois pares de cromosomas homólogos. Admitamos que, durante a primeira divisão, as tétradas cromosómicas se dispõem no equador da célula, de tal modo que se afastem para os respectivos polos os centrómeros de cromosomas homólogos, ou, por outras palavras, que a primeira divisão é sempre reducional para os centrómeros. Se não houver entrecruzamento a primeira divisão será reducional para todos os pares de factores, qualquer que seja a sua posição ao longo do cromosoma; e as tétradas de esporos obtidas serão exclusivamente dicratas.

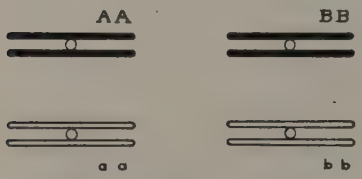


Fig. 1 — Prèredução sem entrecruzamento: tétradas exclusivamente dicratas.

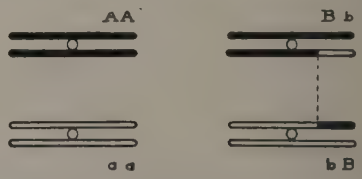


Fig. 2 — Prèredução com entrecruzamento entre o centrómero e o *locus* de Bb; tétradas exclusivamente tètracratas.

Suponhamos agora que num dos pares de cromosomas as coisas se passam assim, sem entrecruzamento, emquanto no outro, portador por exemplo de (Bb), houve um entrecruzamento, no estado de quatro cromatídeos, entre o centrómero e o *locus* de (Bb) de dois cromatídeos homólogos. Que resultará daqui? Para o primeiro par de cromosomas (Aa) a primeira divisão será reducional e a segunda equacional; mas para o outro par de cromosomas (Bb) a primeira divisão só será reducional, para os centrómeros e para os factores localizados entre êstes e o ponto onde se deu o entrecruzamento; para todos os outros factores, colocados para além do ponto de entrecruzamento, a anafase da primeira divisão não separa os homólogos, pois para cada um dos polos marcham um factor (B) e um factor (b); é na segunda divisão

que se separam êstes dois homólogos (B e b) e por conseqüência, para êles, a segunda divisão é que é a reducional. Tudo se passa como se a redução fôsse do tipo mixto e o resultado é uma tétrada tètracrata. Logo, o aparecimento de tétradas dêste tipo não implica de nenhum modo uma postredução e pode perfeitamente explicar-se por entrecruzamentos entre os centrómeros e os *loci* dos factores considerados.

A verificação desta hipótese exige um conhecimento bastante completo dos cromosomas sob o ponto de vista genético. Até agora só foi possível em dois casos: uma Hepatica (*Sphaerocarpus*, KNAPP) e um Ascomiceto (*Neurospora*, LINDEGREEN). Em um e outro caso, não só são possíveis análises de tétradas, mas ainda o conhecimento prévio de mapas cromosómicos, com um número suficiente de factores escalonados ao longo dos cromosomas, permitiu determinar o ponto em que se deu o entrecruzamento.

Nas duas espécies estudadas por KNAPP e LINDEGREEN há sempre prèredução para os centrómeros; a postredução aparente de certas regiões do cromosoma, marcadas com génes de referência, é uma conseqüência de fenómenos de entrecruzamento.

Mas passar-se-ão as coisas realmente assim em todos os casos? Ou haverá, mesmo para os centrómeros, a possibilidade de uma postredução? Por agora não é possível responder a esta pregunta. E para o grupo dos Himenomicetos, que mais particularmente nos interessa, o nosso desconhecimento da localização de genes de referência não permite uma verificação experimental desta hipótese.

COPULAÇÕES ILEGÍTIMAS

À medida que íamos avançando no estudo da redução cromática um outro problema surgia diante de nossos olhos e atraía cada vez com mais fôrça a nossa atenção — o problema das «copulações ilegítimas».

Chamam-se copulações ilegítimas as que desobedecem à lei da incompatibilidade de micélios com um factor comum. Sempre que numa espécie bipolar haplontes do mesmo grupo derem, por cruzamento, uma reacção mais ou menos positiva (A × A ou a × a) estamos em presença duma copulação ilegítima. Nas espécies tètrapolares, copulações ilegítimas são as que se obtêm por cruzamento de micélios de grupos diferentes mas não complementares (por

exemplo AB×aB), pois que nas tètrapolares nunca foi possível obter reacções mais ou menos positivas entre haplontes do mesmo grupo (AB×AB, p. ex.).

Antes de nos ocuparmos dêste assunto já outros autores se tinham interessado pelo estudo das copulações ilegítimas, particularmente BRUNSWIK, VANDENDRIES e OORT. Mas a verdade é que os resultados obtidos tinham sido bastante escassos. De maneira que êste tipo de reacção continuava a ser encarado como uma excepção mais ou menos caprichosa, não obedecendo a nenhum preceito. Nada se sabia ao certo das condições que determinavam o aparecimento das copulações ilegítimas, nem da maneira de as fazer frutificar, nem da citologia dos seus micélios e chapéus, nem da genética da sua descendência.

As conclusões dos outros autores pareciam-nos bastante inconsistentes; e, no entanto, afigurava-se-nos êste assunto um riquíssimo filão, desde que fôsse atacado com métodos suficientemente rigorosos.

Desde os nossos primeiros passos no estudo genético dos Himenomicetos fomos reunindo materiais, observações e bibliografia, para mais tarde atacar êste problema. Mas só muito mais tarde, em 1933, já de regresso da Alemanha e terminados outros trabalhos que trazíamos entre mãos, nos foi possível abordá-lo.

Escolhemos como material de trabalho o mesmo *Coprinus fimetarius* que nos havia servido para as nossas anteriores investigações; e assentámos em que o estudo se faria simultâneamente por processos citológicos e genéticos, de modo que cada resultado, obtido por um dos métodos, pudesse ser verificado pelo outro; e que o estudo genético de cada geração devia ter por base essencialmente a análise de tétradas.

As anteriores observações doutros e as nossas próprias tinham já mostrado que a tendência para a produção de copulações ilegítimas é tanto maior quanto mais novos são os micélios confrontados. A condição ideal devia ser a das culturas bispóricas, com os dois esporos colocados lado a lado na mesma gôta pendente, pois assim os micélios encontrar-se-iam em presença desde a germinação. Adoptámos pois como método de trabalho a realização de culturas bispóricas. Mas, como saber depois a que grupo pertenciam os dois esporos postos na mesma gôta?

Êste problema podia ser resolvido por dois processos diferentes

a) Isolar de uma frutificação normal um certo número de tétradas; semear, de cada tétrada, três esporos e guardar o quarto; o conhecimento, por confronto com os tests, dos grupos a que pertenciam os micélios dos três esporos semeados, permitia sempre deduzir a constituïção genética do quarto esporo que havia sido guardado de cada tétrada;

b) Verificar a reacção dos micélios provenientes dos dois esporos. A experiência demonstrou aquilo que as nossas observações anteriores já faziam prever, isto é, que só três casos eram possíveis. No primeiro caso a cultura bispórica dava uma reacção positiva nítida e o micélio secundário obtido frutificava normalmente; os dois esporos deviam pertencer a grupos complementares (AB e ab, p. ex.) e não ter por isso nenhum factor comum; a análise genética das frutificações obtidas devia confirmar o facto pela verificação, na sua descendência, dos quatro grupos normais e, por conseqüência, da existência nos progenitores dos dois pares de factores (Aa, Bb). No segundo caso a reacção era nìtidamente negativa, sem ansas; os dois esporos ou pertenciam ao mesmo grupo e eram idênticos, ou pertenciam a dois grupos diferentes mas não complementares (AB e Ab, p. ex.). O cruzamento do micélio obtido com os quatro tests devia resolver o problema. Obtinha-se uma só reacção positiva, p. ex. com (AB), então os dois esporos tinham ambos a constituïção (ab); obtinham-se pelo contrário duas reacções positivas, p. ex., com (ab) e (aB), então os dois esporos eram respectivamente (AB) e (Ab). Finalmente, a cultura bispórica dava uma reacção positiva fraca, do tipo das copulações ilegítimas, com poucas ansas, mal formadas e abundantes oídios; o cruzamento dêste micélio com os quatro tests e a análise genética da descendência das frutificações obtidas permitia sempre diagnosticar, com precisão, a constituïção genética dos dois progenitores. Com efeito se êstes pertencessem a grupos diferentes mas não complementares (AB e aB, p. ex.) o cruzamento com os tests havia de dar duas reacções positivas fortes (com ab e Ab) e duas outras negativas, ou quando muito positivas fracas (com AB e aB); e na descendência das frutificações obtidas só poderiam encontrar-se os dois grupos dos progenitores (AB e aB). Se pelo contrário os dois esporos pertencessem a grupos complementares (AB e ab, p. ex.), então as reacções com os quatro tests deviam

ser tôdas do mesmo tipo; e na descendência das frutificações obtidas deviam encontrar-se, não dois grupos, mas quatro.

Ora a experiência demonstrou que tôdas estas previsões se realizavam rigorosamente e que não havia por isso necessidade de recorrer ao primeiro processo, de guardar um esporo de cada tétrada analizada afim de saber a sua constituïção genética antes de o semear — processo extremamente moroso e fatigante que abandonámos depois por desnecessário.

O método das culturas bispóricas permitiu-nos chegar ràpidamente a resultados seguros. Sempre que os dois esporos pertencem a grupos complementares obtem-se uma reacção positiva forte, um micélio secundário normal, que frutifica e produz na geração seguinte os quatro grupos habituais de esporos. Sempre que os dois esporos pertencem ao mesmo grupo, ou a grupos diferentes mas com um factor comum do par que nós chamamos (Aa), obtem-se uma reacção negativa nítida, isto é, um micélio primário que não frutifica. Sempre que os dois esporos pertencem a grupos diferentes, mas possuem um factor comum do par (Bb), a cultura bispórica dá origem a uma copulação ilegítima; o micélio obtido tem poucas ansas e imperfeitas, continua a produzir oídios e frutifica sempre; mas as frutificações obtidas são anormais, quer pela forma, quer pela estrutura citológica e rítmo de desenvolvimento; e na sua descendência só produzem dois grupos, os dos progenitores, em vez dos quatro das frutificações normais.

$$AB \begin{cases} AB\ (-) \\ Ab\ (-) \\ ab\ (+) \\ aB\ (+) \end{cases}$$

Não nos contentámos porém com êstes primeiros resultados e fomos estudar citològicamente os micélios e o desenvolvimento dos carpóforos destas copulações ilegítimas a que, por comodidade, chamaremos micélios e frutificações ilegítimas.

O estudo citológico dêstes micélios ilegítimos mostra que êles se distinguem dos micélios secundários normais por duas características essenciais. Com efeito, nos micélios secundários normais (Fig. 3) as ansas servem para dar passagem a um núcleo de uma célula para a que lhe fica imediatamente atrás; cada ansa tem assim um só septo que a fecha do lado do vértice e é desprovida de núcleo na

fase final. Nos micélios ilegítimos (Fig. 4), pelo contrário, as ansas não chegam a abrir do lado da base da hifa, guardam por isso o núcleo a que deviam dar passagem e são fechadas dos dois lados. Daqui resulta que, em cada filamento, só a célula terminal é binucleada; a cada divisão conjugada do dicárion terminal forma-se uma ansa

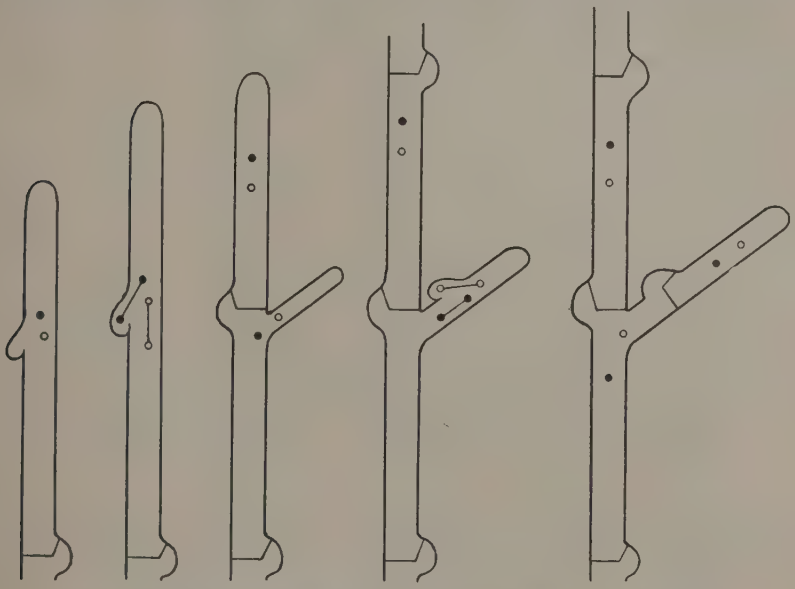


Fig. 3 — Divisões conjugadas e formação das ansas em um micélio secundário normal.

que guarda o seu núcleo, de modo que a célula subterminal, e as laterais que dela resultam por ramificações sucessivas, não têem mais que um núcleo cada uma. Os micélios ilegítimos são simultâneamente secundários e primários; por isso continuam a produzir grande número de oídios e as suas ansas são muito mais raras que no caso dos micélios secundários normais.

As frutificações ilegítimas (Est. II, fig. 8, 9 e 10), têem um rítmo de desenvolvimento mais lento e menos regular que as normais (Est. I, fig. 2, 3, 4 e 5); quando maduras são mais claras, graças ao pequeno número de esporos que produzem (cf. Est. II, fig. 11 e Est. I, fig. 7).

O estudo citológico dêstes carpóforos ilegítimos mostra a

existência lado a lado de basídios, uns com um só núcleo haplóide, outros com dois (Est. II, fig. 12). Nos basídios binucleados dá-se depois uma cariogamia (Est. II, fig. 14), seguida de uma dupla divisão, com formação de quatro núcleos haplóides e logo a seguir de quatro esporos, como no caso normal. Emquanto nos basídios uninucleados não há, nem podia haver, redução cromática pois que o seu único núcleo é haplóide. Êste núcleo pode dividir-se uma ou duas vezes, dando assim origem a dois ou a quatro núcleos igualmente haplóides.

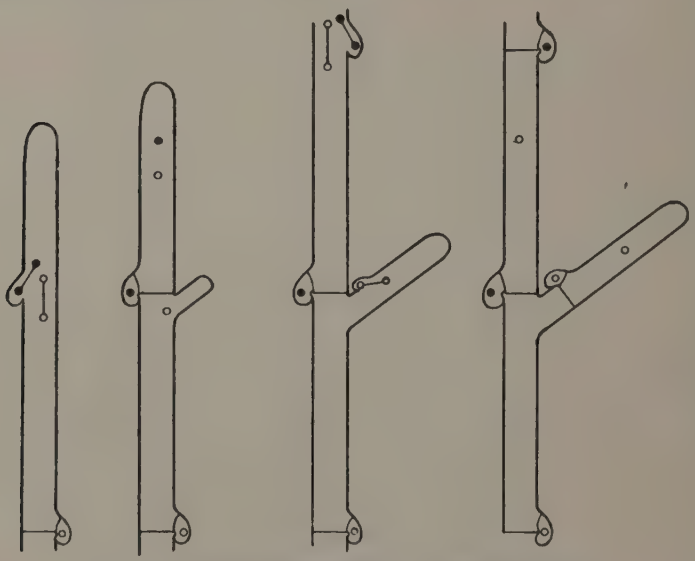


Fig. 4 — Divisões conjugadas e formação das ansas em um micélio «ilegítimo».

Dos basídios uninucleados um grande número aborta e não chega a formar esporos. A maior parte aborta no estado de dois núcleos (Est. II, fig. 15 e 16), a seguir à primeira divisão, provàvelmente em conseqüência de uma distribuïção irregular dos univalentes e da perda de cromosomas em atrazo no final da primeira anafase (Est. III, fig. 20). Os que terminam o seu desenvolvimento dão tétradas perfeitamente normais.

A análise genética das tétradas dêstes carpóforos ilegítimos revela a existência de dois tipos de tétradas, dicratas e monocratas. Assim, se os esporos que deram origem à copulação ilegítima tinham

respectivamente a constituïção (Ab) e (ab), os dicários das células terminais das hifas e dos basídios binucleados serão (Ab + ab), e as tétradas dicratas 2 (Ab) + 2 (ab); as células uninucleadas dos micélios mixtos, bem como os basídios de um só núcleo que delas derivam, serão ou (Ab) ou (ab), conforme o núcleo que a cada divisão conjugada ficou aprisionado na ansa fechada; e as tétradas monocratas que dêstes basídios monocarióticos resultam serão

	aB	Ab	ab	AB
	1	2	3	4
Ab 1	+	—	—	—
Ab 2	+	—	—	—
ab 3	—	—	—	+
ab 4	—	—	—	+

Quadro IV

Tétradas dicratas (84 %) de uma frutificação ilegítima, provenientes de basídios binucleados.

	aB	Ab	ab	AB
	1	2	3	4
Ab 1	+	—	—	—
Ab 2	+	—	—	—
Ab 3	+	—	—	—
Ab 4	+	—	—	—

	aB	Ab	ab	AB
	1	2	3	4
ab 1	—	—	—	+
ab 2	—	—	—	+
ab 3	—	—	—	+
ab 4	—	—	—	+

Quadros V e VI

Tétradas monocratas (16 %) de uma frutificação ilegítima, provenientes de basídios uninucleados.

respectivamente 4 (Ab) e 4 (ab). Mas a percentagem de tétradas monocratas é sempre diminuta, cêrca de 16 % do total; a grande maioria dos basídios uninucleados aborta.

Êste estudo das copulações ilegítimas, levado a cabo com métodos paralelos de trabalho, que mùtuamente se completavam e a cada passo passibilitavam um rigoroso contrôle dos resultados obtidos, permitiu uma solução completa e convincente de todos os problemas que nos tínhamos proposto.

FRUTIFICAÇÕES HAPLÓIDES

Outro problema, que de longa data nos preocupava, era o das frutificações haplóides.

Sabia-se que na grande maioria dos Himenomicetos há uma alternância regular de gerações, uma fase dicariótica, dando origem a basídios diplóides, alternando com uma fase haplóide, os esporos e micélios primários. Em alguns casos, bastante raros, todo o ciclo

evolutivo se passa na fase haplóide. Em outros, mais raros ainda, conhecem-se, na mesma espécie, formas em que todo o ciclo evolutivo se passa na fase haplóide, ao lado de outras com basídios binucleados e uma cariogamia normal.

Precisamente para a espécie com que estávamos trabalhando, o *Coprinus fimetarius*, as opiniões eram absolutamente discordantes. Emquanto uns afirmavam que as culturas monospóricas frutificavam normalmente e até produziam basídios binucleados, outros tinham observado a completa esterilidade dos micélios primários.

Durante muitos anos passaram-nos pelas mãos milhares de culturas monospóricas sem que nenhuma tivesse frutificado; quando muito apareciam, de tempos a tempos, em algumas culturas, pequeníssimos esboços de frutificações, que abortavam muito cedo, sem amadurecerem, nem abrirem, nem produzirem esporos.

A primeira vez que nos apareceu uma cultura monospórica frutificando foi em 1934. Como estávamos trabalhando com isolamento de tétradas foi facílimo de verificar que se tratava de uma mutação. Com efeito, das quatro culturas monospóricas desta tétrada, três eram estéreis, como era de regra, emquanto que a quarta produzia magníficas frutificações (Est. III, fig. 17 e 18), que apenas se distinguiam das normais por formarem poucos esporos e não os deixarem caír.

O estudo citológico do micélio mostrou que se tratava de um micélio primário típico, sem ansas nem divisões conjugadas e com grande número de oídios. Os basídios dos carpóforos produzidos por êstes micélios continham desde o comêço um só núcleo haplóide. Êste núcleo conduzia-se exactamente como os núcleos haplóides dos basídios uninucleados das frutificações ilegítimas, isto é, podia passar por uma ou duas divisões sucessivas e mais ou menos irregulares pelo que respeita à distribuïção dos univalentes. Grande número de basídios abortava, quási sempre após a primeira divisão; os que chegavam ao fim do seu desenvolvimento davam tétradas de aspecto normal.

O estudo genético mostrou que êste micélio dava reacções positivas normais com haplontes do grupo complementar; os micélios secundários assim obtidos originavam frutificações perfeitamente normais, quer do ponto de vista citológico, quer pelo que diz respeito ao comportamento genético da descendência. Mas as tétradas desenvolvidas sôbre os chapéus haplóides eram tôdas

monocratas e os micélios pertenciam ao mesmo grupo do micélio mutante que havia produzido a frutificação.

A propriedade de produzir carpóforos haplóides manteve-se na descendência dêste mutante durante gerações sucessivas.

Pouco mais ou menos pela mesma época apareceram dois outros mutantes igualmente capazes de frutificar em culturas monospóricas (Est. III, figs. 21, 22, 23 e 24). Mas os seus micélios conduziam-se como os das copulações ilegítimas, isto é, produziam pseudo-ansas, às vezes acompanhadas de divisões conjugadas; e as frutificações desenvolvidas sôbre êstes micélios possuiam dois tipos de basídios, uns uninucleados e haplóides, outros binucleados onde se realizava mais tarde uma cariogamia. Mas as tétradas produzidas por uns e outros eram do mesmo tipo e tôdas monocratas.

Êste estudo das frutificações haplóides, bruscamente interrompido pela nossa saída de Coimbra em 1935, precisava de ser retomado e aprofundado, empregando os mesmos métodos de que nos servimos — observação citológica dos micélios e do desenvolvimento dos chapéus e análise de tétradas como base do trabalho genético. Tal como o deixámos o nosso trabalho provou já que a faculdade de frutificar na fase haplóide não é uma propriedade mais ou menos geral das culturas monospóricas, favorecida em maior ou menor grau por condições de meio. Nas estirpes com que trabalhámos e das mais variadas origens — portuguesas, francesas, alemãs — essa faculdade não existe normalmente na nossa espécie (*Coprinus fimetarius*); muito raramente nos apareceram culturas monospóricas capazes de frutificar, mas sempre que isso aconteceu a faculdade de produzir carpóforos haplóides surgiu bruscamente, por mutação, a partir de estirpes certamente desprovidas dessa faculdade e manteve-se depois em gerações sucessivas.

HEREDITARIEDADE DOS FENÓMENOS DE NANISMO

Todos os que têem trabalhado com culturas monospóricas de fungos sabem que o vigor de culturas da mesma origem e desenvolvidas nos mesmos meios varia por vezes consideràvelmente dumas para outras. Pela nossa parte tivemos freqüentemente ocasião de verificar que entre as culturas monospóricas obtidas do mesmo chapéu de *Coprinus fimetarius*, umas se desenvolviam vigorosamente, com abundante micélio aério, emquanto outras

produziam uns micélios apenas visíveis a ôlho nú a que chamámos micélios anões.

Durante anos fomos acumulando observações sôbre o mecanismo da determinação dêstes fenómenos de nanismo. Quando em 1938 M.lle Dr. SIMONNE BALLE, Assistente da Universidade de Bruxelas, veio a Paris fazer um estágio no nosso Laboratório, para aprender as técnicas de microdissecção e genética dos fungos, propusemos-lhe que estudasse, em colaboração comnosco, a hereditariedade do nanismo nos Coprinos.

Para a realização dêste trabalho foi necessário recorrer a uma nova técnica, pois os anões eram tão pequenos que não era possível, pelos métodos usuais, cruzá-los com os tests para verificar a que grupo pertenciam. Tínhamos porém observado que quási todos êstes anões, mesmo os mais microscópicos, produzem em geral grande número de oídios. Alguns dão a impressão que se desfazem literalmente em oídios. Se com êstes oídios se efectua uma suspensão e se desta se lançam duas ou três gôtas sôbre cada um dos quatro tubos de gelose onde começam a desenvolver-se os quatro tests da raça geográfica com que estamos a trabalhar, só aparecem ansas em um dos tubos, aquele que contém o test complementar do micélio anão.

Foi êste método da suspensão de oídios, combinado com as técnicas anteriormente descritas, que nos permitiu, não só determinar o «sexo» de cada anão, mas ainda obter, a partir dêstes, cruzamentos férteis com os normais e estudar a sua descendência.

Os problemas que nos propuzemos estudar foram os seguintes:

a) São hereditários êstes fenómenos de nanismo? Nesse caso existem factores mendelianos responsáveis por êsses fenómenos? Quantos pares? E associados ou independentes?

b) Que influência podem exercer as condições de meio sôbre micélios de constituïção genética conhecida?

1.º caso: Nanismo genotípico. De uma frutificação em cuja descendência apareciam com grande freqüência micélios anões (figs. 5, 6 e 7) isolaram-se mais de 200 tétradas. Em 101 destas tétradas germinaram os quatro esporos e em cada uma havia regularmente dois micélios normais e dois anões. Nas restantes tétradas, incompletas, nunca se observou mais de dois micélios de cada um dos tipos.

Desta primeira geração, o cruzamento de micélios normais complementares produzia uma descendência exclusivamente de normais. O cruzamento de um anão com um normal dava origem a micélios secundários e frutificações absolutamente normais; mas

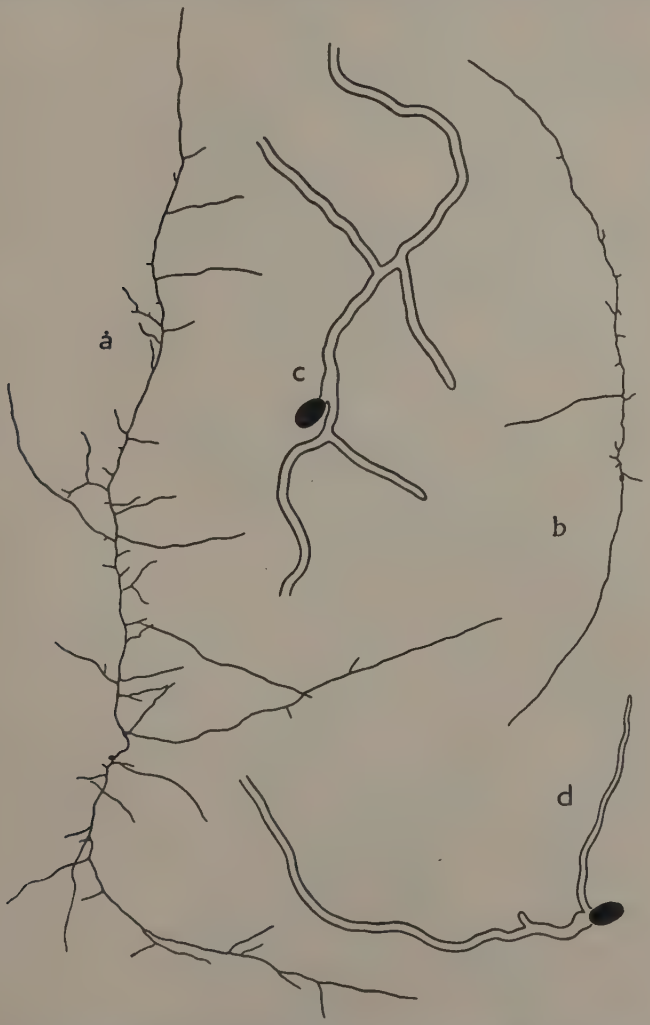


Fig. 5 — Desenvolvimento de micélios primários normais; *a*, micélio de um dia, muito vigoroso; *b*, micélio da mesma idade, crescimento fraco (×66); *c* e *d*, aspectos de hifas de micélios normais (×333).

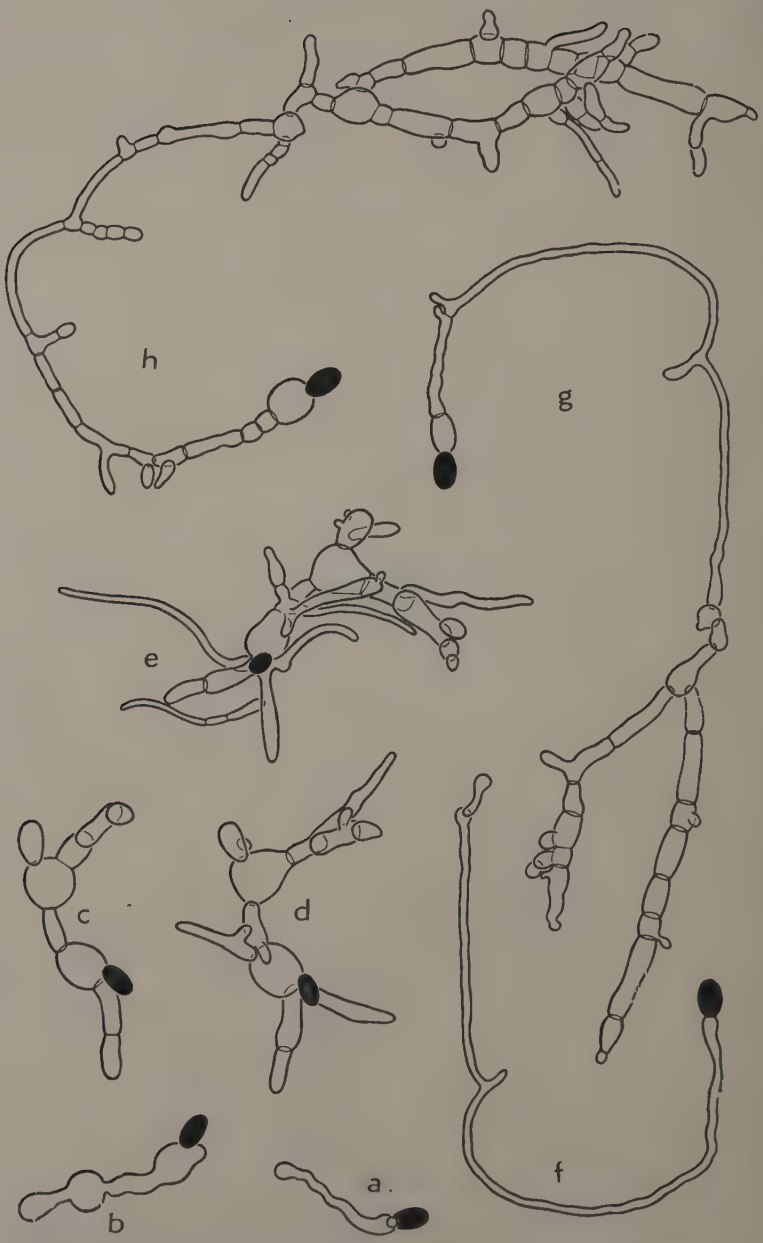


Fig. 6 — Desenvolvimento de micélios anões: *a* a *e*, aspectos quotidianos de um micélio anão do primeiro ao quinto dia; *f* a *h*, idem de um outro micélio anão, do primeiro ao terceiro dia (× 333.)

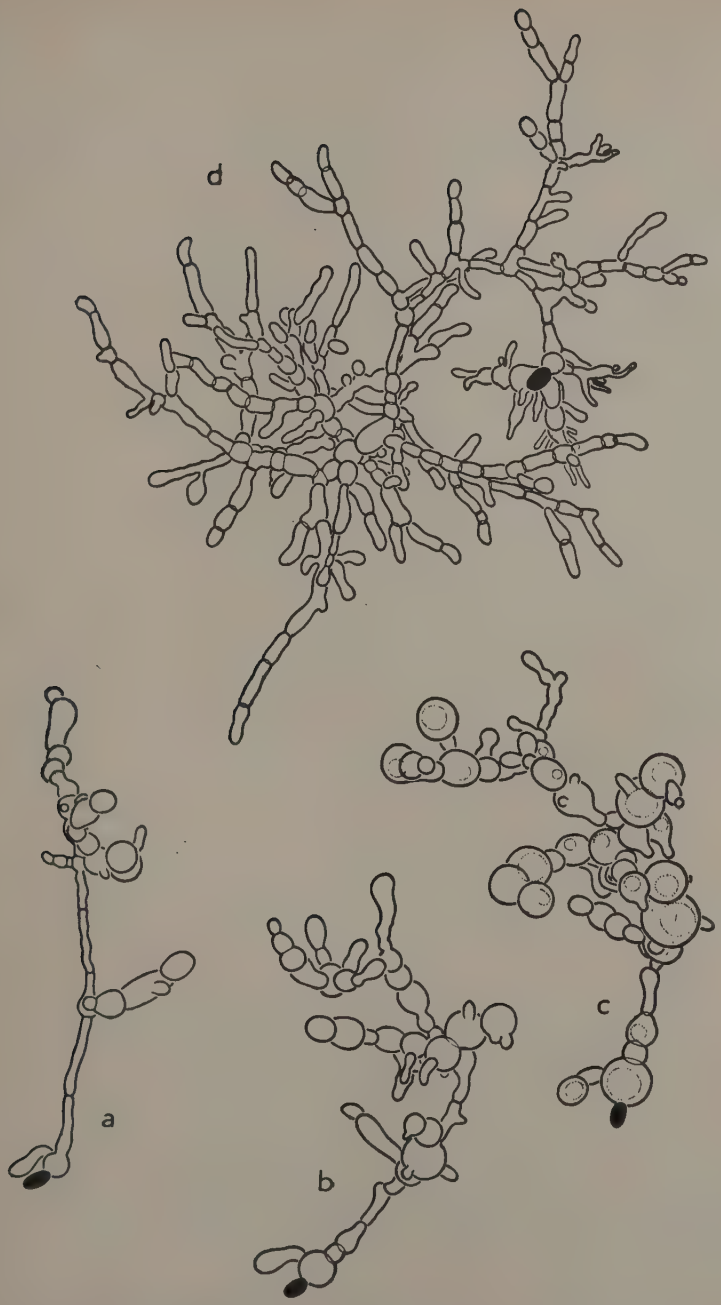


Fig. 7 — Desenvolvimento de micélios anões: *a* a *c*, aspectos quotidianos de um micélio anão do terceiro ao quinto dia; *d*, anão de oito dias (×266).

na descendência apareciam de novo, em cada tétrada, dois anões e dois normais. Finalmente, o cruzamento de anões complementares é inviável; nunca foi possível obter micélios secundários de tais cruzamentos.

A análise genética dêste primeiro caso permite já responder a algumas das preguntas postas. Os resultados obtidos permitem afirmar: Que há um tipo de nanismo hereditário; que tudo se passa como se existisse um par de factores mendelianos, e um só par, responsável por êstes fenómenos.

Designamos êste par de factores pelo símbolo (Nn) sendo a presença de (N) indispensável à produção do tipo normal de micélio.

É muito possível, porém, que se não trate de uma verdadeira mutação e que os micélios anões sejam muito simplesmente a conseqüência de uma deficiência. No estado actual dos nossos conhecimentos sôbre a genética desta espécie não é possível verificar experimentalmente uma ou outra destas duas hipóteses. Seja porém qual fôr a explicação real do fenómeno tudo se passa como se houvesse um par de factores alèlomorfos (Nn) responsável por esta disjunção regular. Nos micélios secundários provenientes do cruzamento ($N \times n$) a presença de (N) uma só vez é suficiente para a determinação de um crescimento normal; apesar de que os dois factores estão separados em dois núcleos diferentes, (N) actua como dominante em relação a (n).

A análise genética mostrou por outro lado que não se verifica qualquer associação entre os três pares de factores (Nn, Aa, Bb); é natural que estejam localizados sôbre três pares de cromosomas diferentes.

2.º Caso: Nanismo fenotípico. De uma outra frutificação, estudada em 1935, onde os micélios anões apareciam em percentagem muito elevada, não foi possível observar uma disjunção regular dos dois tipos de crescimento. Por exemplo, em uma série de cinco tétradas encontraram-se três micélios normais e dezassete anões. O cruzamento de normais dava uma descendência exclusivamente de normais. Do confronto de um normal com um anão complementar resultavam micélios secundários e frutificações perfeitamente normais e na descèndência não apareciam micélios anões. O cruzamento de anões complementares era, como no caso anterior, inviável.

A explicação mais simples dêstes resultados é de que estamos em presença de um tipo de nanismo puramente fenotípico, ainda que não tenha sido possível determinar experimentalmente quais os factores que o determinaram.

Ao lado dêstes dois casos bastante simples, que nos provam a existência de dois tipos de nanismo, um certamente genotípico, o outro muito provàvelmente fenotípico, outros casos nos apare-

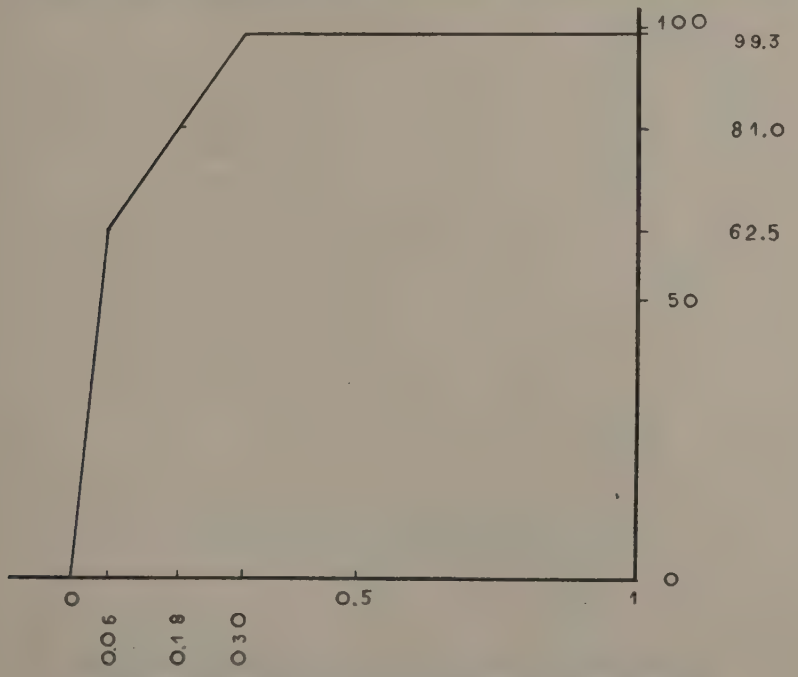


Fig. 8 — Percentagem de esporos germinados (em ordenadas) em função da tensão osmótica (em abcissas) do meio de cultura, medida em atmosferas (meios de fraca tensão).

ceram de interpretação mais difícil e que nos não foi possível estudar convenientemente. Trata-se de um tipo de nanismo, muito provàvelmente hereditário, mas onde não há uma disjunção regular em cada tétrada, de dois normais e dois anões, e onde, por outro lado, se encontra tôda uma gama de intermediários entre um e outro dêstes dois tipos. É possível que o nanismo aqui seja determinado pela acção conjunta de vários pares de factores reforçan-

do-se uns aos outros; ou que se trate de um caso de redução da probabilidade de manifestação (Penetranz) e do grau de expressão (Expressivität) de um gene, do mesmo género do que foi estudado por TIMOFEEFF-RESSOVSKY para o factor (vti) da *Drosophila funebris*.

Outro aspecto interessante dêste trabalho foi o estudo da influência das condições exteriores sôbre o fenotipo de micélios de constituïção genética conhecida. Servimo-nos para isso de cruza-

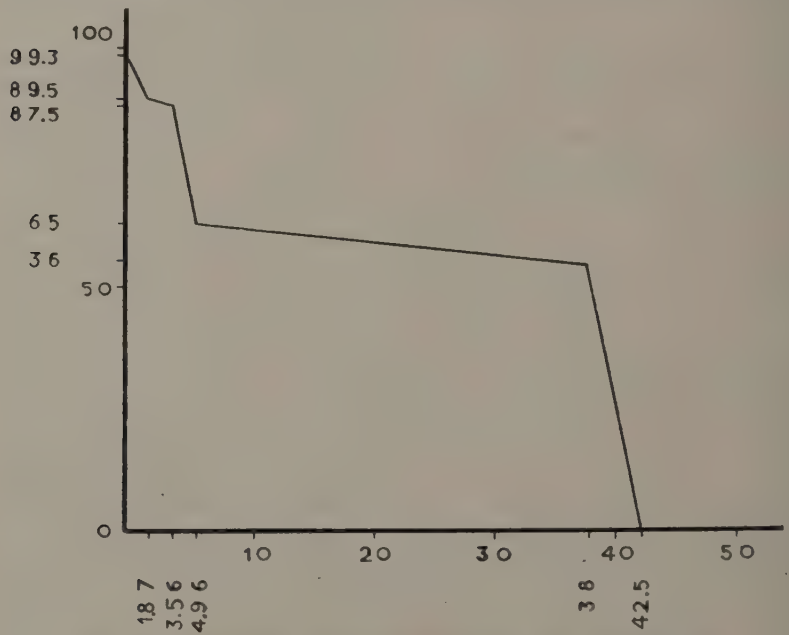


Fig. 9 — Percentagem de esporos germinados (em ordenadas) em função da tensão osmótica (em abcissas), do meio de cultura, medida em atmosferas (meios de alta tensão).

mentos de anões com normais onde sabíamos que, em cada tétrada, apareciam sempre dois anões e dois normais.

O factor cuja influência estudámos com mais rigor foi a pressão osmótica.

A decocção de estrume de cavalo com que habitualmente trabalhamos possui uma pressão osmótica sensìvelmente de uma atmosfera. Por diluïções sucessivas obtiveram-se meios de cultura de pressão osmótica decrescente até poucas centéssimas de atmos-

fera. Por adjunção de sacarose ao decocto normal preparou-se uma série de meios de pressão osmótica crescente até um limite superior de mais de quarenta e duas atmosferas.

Ora os esporos do nosso *Coprinus* conservam a sua capacidade germinativa em meios de cultura cujas pressões osmóticas variam dentro de limites absolutamente fantásticos. Assim a uma pressão de 0,06 atm. ainda germinam 62,5 % dos esporos; e a 38 atm.

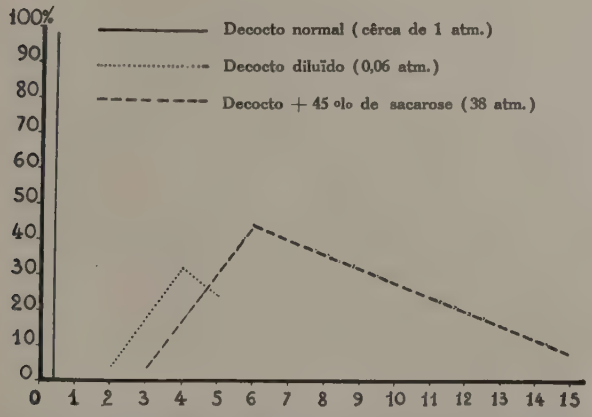


Fig. 10 — Percentagem de esporos germinados (em ordenadas) e prasos de germinação, medidos em dias (em abcissas), para meios de cultura de diferente tensão osmótica.

continuam a germinar 56 %!! Mas para fora dêstes dois limites as curvas de germinabilidade caem bruscamente, de modo que não é possível obter germinações nem na água pura nem acima de 42,5 atm.

À medida que nos afastamos da pressão óptima (1 atm.) para um e outro lado diminui, muito lentamente, a percentagem de esporos germinados e aumentam, por outro lado, progressivamente os prasos de germinação. Mas a cada pressão osmótica experimentada a percentagem de anões e normais mantem-se sensivelmente a mesma. Por outras palavras, a constituïção genotípica dos esporos não lhes confere uma sensibilidade especial pelo que respeita à capacidade germinativa. Os dois tipos comportam-se do mesmo modo a tôdas as pressões.

Já o mesmo não acontece pelo que respeita ao aspecto morfológico dos micélios. Entre 0,06 e 12 atm. é sempre possível distinguir, em cada tétrada, os dois anões dos dois normais. Mas acima de 12 atm., à medida que a pressão osmótica aumenta, os micélios que deviam ser normais tomam um tipo cada vez mais semelhante ao dos anões; de modo que, a partir duma certa altura, observam-se, em cada tétrada, quatro micélios sensìvelmente do mesmo aspecto e nada permite já distinguir, pela forma exterior e tipo de crescimento, os dois genotipos. Que tal facto se deve atribuir exclusivamente à pressão osmótica do meio demonstra-o a circunstância de que açúcares de pêso molecular diferente (sacarose e glucose, p. ex.) actuam, não em função da sua concentração, mas sim da pressão osmótica a que dão origem.

Êstes factos permitiram-nos emitir uma hipótese explicativa das relações entre um géne, que a análise genética pôs em evidência, e o respectivo fenotipo.

Se um micélio (N) apresenta um aspecto normal, em meios de pressão osmótica muito variável, é porque êsse micélio possui a faculdade de se pôr em equilíbrio osmótico com o meio em que vive; acima de um certo limite superior o equilíbrio estabelece-se cada vez com maior dificuldade, o que acarreta perturbações fisiológicas que se traduzem por certas anomalias de forma das células e do rítmo de crescimento, e conduzem ao tipo anão. Uma mutação de (N) em (n), ou uma deficiência na região de (N), acarreta como conseqüência a perda, para os respectivos micélios, dessa capacidade de se pôrem em equilíbrio osmótico com o meio exterior, já para decocções de pressão osmótica extremamente fraca.

Evidentemente não consideramos esta hipótese como demonstrada. Pretendemos apenas com ela dar uma explicação lógica dos resultados obtidos, que trabalhos ulteriores nesta direcção confirmarão ou não. Aqui o que nos parece sobretudo interessante é a relativa simplicidade da relação entre o genotipo e o fenotipo e, por outro lado, as facilidades de estudo de ordem genética e fisiológica que o caso oferece.

ESTUDO DO FENÓMENO DE BULLER

Demos o nome de «Fenómeno de Buller», em homenagem ao botânico canadiano que o descobriu, à acção de diploïdização de

um micélio primário por um outro micélio secundário da mesma espécie.

BULLER trabalhava com uma espécie a que êle chamava *Coprinus lagopus* e que nós tivemos ocasião de verificar, pela observação das frutificações e cruzamento de haplontes, ser idêntica ao nosso *Coprinus fimetarius*.

Ora nesta espécie BULLER verificou que cada micélio primário é susceptível de passar ao estado de micélio secundário, de ser «diploïdizado», para empregar a sua terminologia, não só por cruzamento com um outro micélio primário complementar, mas ainda por confronto com um micélio já secundário.

Nas espécies bipolares só há um tipo de confrontação possível (A/ A + a); o núcleo do micélio primário é sempre compatível pelo menos com um dos núcleos do micélio secundário. Já o mesmo não acontece nas espécies tètrapolares, onde há dois tipos de confrontações, compatíveis e incompatíveis. No primeiro tipo (AB / AB + ab) o núcleo do micélio primário é compatível com um dos núcleos do micélio secundário; no segundo caso (AB / Ab + + aB) o núcleo do micélio primário é incompatível com os dois tipos de núcleos do micélio secundário. Tanto numas como noutras o micélio primário pode ser diploïdizado, mas nas confrontações compatíveis a diploïdização é mais freqüente e mais regular.

Como foram interpretados êstes resultados?

BULLER explica as confrontações compatíveis (AB / AB + ab) pela passagem de um ou mais núcleos (ab) do micélio secundário para o micélio primário, núcleos que vão depois formar dicários (AB + ab) com os núcleos (AB) que lá encontraram (fig. 11). Mais difícil porém é a interpretação das confrontações incompatíveis. Nestas, com efeito, uma análise genética sucinta da descendência dos chapéus obtidos sôbre o micélio primário, após a sua diploïdização, havia já mostrado a BULLER a existência dos quatro grupos «sexuais» (AB, ab, Ab, aB); por conseqüência no nosso exemplo anterior (AB / Ab + aB) o micélio primário (AB) não pode ter sido diploïdizado por nenhum dos dois tipos de núcleos (Ab ou aB) existentes no micélio secundário, pois, se assim fôsse, tratar-se-ia, em qualquer dos casos, de uma copulação ilegítima, em cuja descendência não poderiam encontrar-se mais de dois grupos «sexuais», os dos respectivos progenitores.

Diante desta dificuldade BULLER aventa duas hipóteses explica-

tivas. Ou se trata de uma mutação, em um dos núcleos do micélio secundário (p. ex., de Ab em ab), capaz de produzir naquele micélio um núcleo (ab), compatível com os núcleos (AB) do micélio primário. Ou se trata de uma cariogamia somática, seguida de redução cromática entre os dois núcleos do micélio secundário (Ab + aB), da qual resultariam os quatro tipos de núcleos (AB, ab, Ab, aB) e entre êles os núcleos (ab), indispensáveis à diploïdização de (AB).

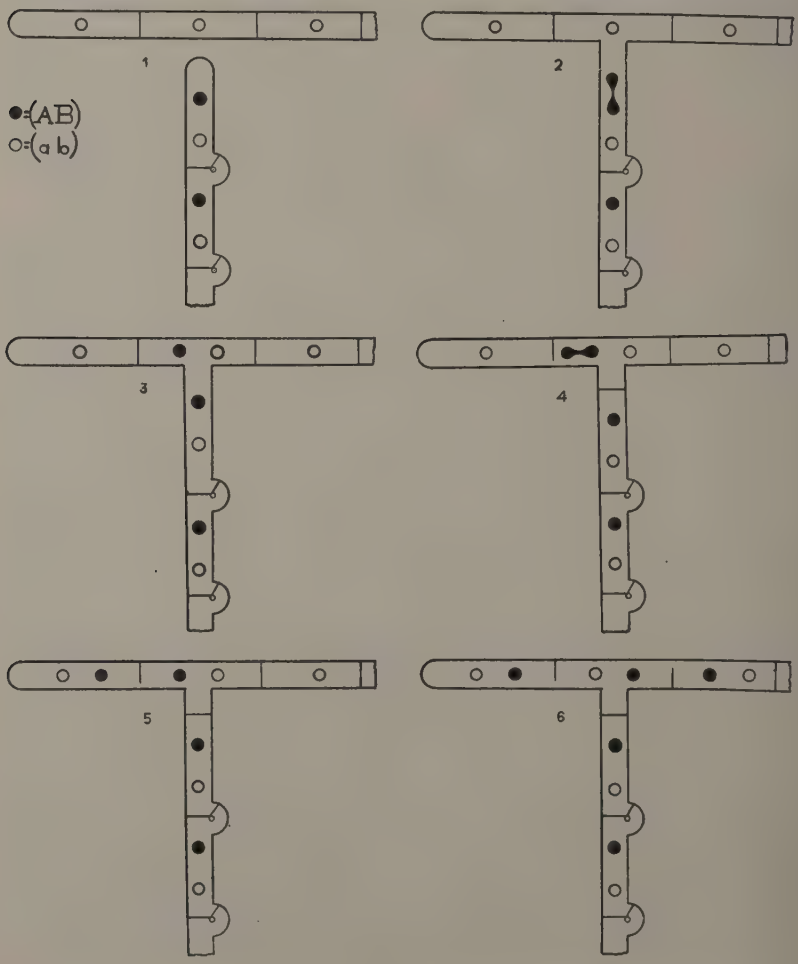


Fig. 11 — Diploïdização de um micélio primário (ab) por um micélio secundário compatível (AB + ab).

Mas percebe-se claramente que o próprio autor não está muito convencido da verosimilhança de qualquer das suas explicações.

Pouco depois RAWITSCHER (33), discutindo os resultados de BULLER, apresenta uma hipótese bastante engenhosa para a explicação das confrontações incompatíveis. RAWITSCHER admite que em uma confrontação (AB / Ab + aB) os núcleos (AB) do micélio primário não tomam parte na formação dos novos dicários; êstes não são outra coisa que os dicários do micélio secundário (Ab + + aB) que migraram através as hifas do micélio primário e aí foram proliferar por sucessivas divisões conjugadas.

DICKSON (34, 35, 36a, 36b), trabalhando com uma espécie bipolar, o *Coprinus sphaerosporus*, e uma outra tètrapolar, o *Coprinus macrorhizus*, chega às seguintes conclusões:

Nas espécies bipolares, após uma confrontação ($\boxed{A}$ / A + a) formam-se, sôbre o micélio diploïdizado, dois tipos de dicários: uns provêem do micélio secundário (A + a), por migração; outros formaram-se por associação de um núcleo $\boxed{A}$ do micélio primário com um outro (a) vindo do micélio secundário.

Nas espécies tètrapolares as confrontações compatíveis realizar-se-iam por um mecanismo semelhante ao das espécies bipolares, isto é:

$$(\boxed{AB} / AB + ab) = (\boxed{AB} + ab) + (AB + ab);$$

o micélio primário, após a diploïdização, teria também dois tipos diferentes de dicários. Emquanto que nas confrontações incompatíveis (AB / Ab + aB) DICKSON admite que nos chapéus desenvolvidos sôbre o micélio primário diploïdizado há dois tipos de basídios, uns apogâmicos, com um só núcleo (AB) proveniente do micélio primário, outros binucleados com os dicários (Ab + aB) imigrados do micélio secundário.

As conclusões de DICKSON pareciam-nos pouco consistentes e apoiadas em métodos de trabalho que nos não mereciam grande confiança. Resolvemos por isso atacar êste problema, que de há muito atraía a nossa atenção, com técnicas absolutamente seguras que permitissem chegar a conclusões indiscutíveis.

a) *As confrontações compatíveis*

Se queremos conhecer o mecanismo da diploïdização em uma confrontação compatível (AB / AB + ab) é indispensável marcar

com genes de referência os três tipos de núcleos, os do micélio secundário e os do micélio primário. Ora se em vez de trabalharmos com haplontes de uma única raça geográfica usarmos culturas de duas raças geográficas, diferentes pelos seus factores de esterilidade (uma, p. ex., Aa, Bb, outra A_1 a_1, B_1 b_1), podemos combinar a constituïção genética dos três tipos de núcleos de maneira que os factores de esterilidade sirvam, ao mesmo tempo, de genes de referência e permitam assim marcar os núcleos e segui-los para onde êles forem.

Vejamos um caso concreto. Tomemos um micélio primário (ab) e repiquemo-lo sôbre uma delgada camada de gelose em placa de Petri, ou, melhor ainda, em garrafa de Roux. Ao cabo de poucos dias, quando o círculo de crescimento tiver atingido um diâmetro de quatro a cinco centímetros, verificamos por transparência ao microscópio que as hifas são desprovidas de ansas e têem o tipo de ramificação característico dos micélios primários. Junto do bôrdo do micélio primário coloquemos um pequeno inóculo de um micélio secundário de constituïção (A_1 B_1 + AB). Um a dois dias depois dos dois micélios terem entrado em contacto começam a aparecer ansas à periferia do micélio primário, a princípio na região mais próxima do inóculo secundário, depois a partir desta região, gradual e progressivamente em tôda a volta, até atingir o ponto diametralmente oposto. O micélio primário (ab) encontra-se agora completamente diploïdizado por confrontação com o inóculo secundário (A_1 B_1 + AB). Tomemos uma pequena porção dêste micélio assim diploïdizado, da região mais afastada daquela onde semeámos o inóculo secundário, para termos a certeza absoluta de que o que repicamos são hifas que pertenciam apenas ao micélio primitivamente primário (ab), e ponhamo-lo a desenvolver em um cristalizador com estrume esterilizado. Logo que apareçam frutificações isolemos tétradas e façamos a sua análise genética por cruzamento dos micélios desenvolvidos com os oito tests das duas raças geográficas com que estamos trabalhando (AB, ab, Ab, aB e A_1 B_1, a_1 b_1, A_1 b_1, a_1 B_1). Esta análise permite-nos inferir com tôda a segurança da constituïção genética dos núcleos diplóides dos basídios e daí deduzir, dos três tipos de núcleos que se encontravam em presença (ab, A_1 B_1 e AB) quais foram os que se associaram para a constituïção dos dicárions do novo micélio secundário.

No caso concreto de que nos estamos ocupando ($ab / A_1\ B_1 + AB$) o estudo de vinte e oito tétradas completas bem como de muitas outras incompletas e de grande número de esporos isolados mostrou que os núcleos diplóides de todos os basídios tinham a constituïção genética (A_1 a, B_1 b). Quere isto dizer que os núcleos (AB) do inóculo secundário não tomaram parte na formação dos dicários do micélio diploïdizado e que por conseqüência êstes dicários resultaram da associação de um núcleo (ab) do micélio primário com um outro ($A_1\ B_1$) do micélio secundário.

Por outro lado a análise genética de frutificações obtidas a partir de inóculos tirados de regiões do micélio diploïdizado as mais afastadas umas das outras mostram, por tôda a parte, a mesma constituïção genética. Quere isto dizer que, ao contrário do que pretendia DICKSON, não só as frutificações não são quimeras, como os próprios micélios diploïdizados não são mictodiplontes; umas e outros são homocarióticos pelo que respeita aos factores de esterilidade.

Desta e de muitas dezenas de outras confrontações do mesmo tipo foi possível deduzir a seguinte lei: Se os dois tipos de núcleos do micélio secundário são ambos compatíveis com os núcleos do micélio primário, os novos dicários são todos do mesmo tipo e formam-se sempre por associação de núcleos do micélio primário com um dos dois tipos de núcleos do micélio secundário, sempre o mesmo para cada confrontação. Assim:

$$(ab / A_1\ B_1 + AB) = ab + A_1\ B_1$$

Se um dos núcleos do micélio secundário é incompatível com os núcleos do micélio primário, por comunidade de um ou de dois factores de esterilidade, os novos dicários formam-se por associação de núcleos do micélio primário com os núcleos do micélio secundário que com êles são compatíveis. Assim:

$$(A_1\ b_1 / Ab + A_1\ B_1) = A_1\ b_1 + Ab$$

Em mais de cinqüenta confrontações compatíveis estudadas até agora não encontrámos nenhuma excepção à primeira destas leis; mas deparámos com uma excepção à segunda lei. Foi o caso da confrontação ($a_1\ b_1 / a_1\ B_1 + ab$) que, em vez de produzir dicários de constituïção ($a_1\ b_1 + ab$) como era de esperar, deu uma frutificação ($a_1\ B_1 + ab$). Neste caso os núcleos do micélio

primário não contribuíram para a formação dos novos dicários, que migraram do micélio secundário através das hifas do micélio primário.

A hipótese de RAWITSCHER pode por conseqüência verificar-se, ainda que muito raramente.

Mas no caso geral, quando os novos dicários se formam por associação de núcleos do micélio primário com outros vindos do micélio secundário, qual é a origem dêstes últimos? Serão núcleos que pertenciam a dicários e se tornaram livres, ou por simples dissociação dos seus companheiros, ou por uma divisão não conjugada? Ou serão pelo contrário, como pretende DICKSON, elementos livres, desemparelhados, do micélio secundário, que nunca pertenceram a nenhum dicário?

Êste problema tem uma certa importância e a sua solução permitiria averiguar até que ponto os dois elementos de um dicário formam uma unidade indissolúvel.

Se tais núcleos livres existem em um micélio secundário êles provêem, segundo DICKSON, de elementos que no momento da diploïdização não encontraram parceiros para formarem dicários. Assim, se um grande micélio (AB) é diploïdizado por um pequeno inóculo (ab) acontecerá que o número de núcleos (ab) que passam para o micélio (AB) e vão proceder à sua diploïdização não será suficiente para formar dicários com todos os núcleos do micélio primário (AB), de modo que, ao lado dos dicários (AB + ab) ficarão existindo muitos núcleos livres (AB). O micélio secundário obtido teria na realidade a seguinte constituïção [(AB + ab) + AB].

Se assim fôr deve ser possível demonstrá-lo experimentalmente.

Com efeito, repiquemos sôbre gelose, em uma grande garrafa de Roux, dois micélios primários compatíveis (AB e A_1 B_1) a uma distância de oito a dez centímetros um do outro (fig. 12). Logo que os dois círculos se toquem começa a diploïdização; de cada um dos micélios migram para o lado oposto um certo número de núcleos que vão formar dicários com os do micélio complementar. Assim os dois micélios secundários formados terão os mesmos dicários (AB + A_1 B_1); mas se houver núcleos livres remanescentes êstes serão à extrema esquerda (AB) e à extrema direita (A_1 B_1). Os micélios secundários repicados das duas extremidades deviam pois, nesta hipótese, representar-se da seguinte forma: à esquerda [(AB + A_1 B_1) + AB] e à direita (A_1 B_1 + AB) + + A_1 B_1 . E se fôssem os núcleos livres os que, em uma confron-

tação dêstes micélios secundários com o mesmo micélio primário (ab), dessem origem à formação dos novos dicários, então as duas confrontações recíprocas deviam dar regularmente resultados diferentes; isto é:

$$ab/[(AB + A_1B_1) + AB] = ab + AB$$
$$ab/[(A_1B_1 + AB) + A_1B_1] = ab + A_1B_1$$

Ora em tôdas as confrontações recíprocas realizadas segundo êste esquema os resultados obtidos são sempre os mesmos, quer o

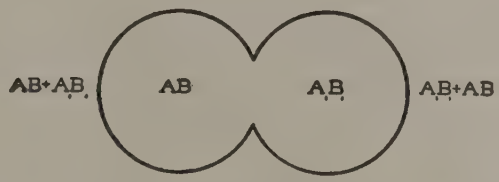


Fig. 12 — No encruzamento ($AB \times A_1B_1$), obtem-se, na extrema esquerda, um micélio secundário ($AB + A_1B_1$), com núcleos (A_1B_1) nas hifas de (AB); e na extrema direita o micélio recíproco ($A_1B_1 + AB$), com núcleos (AB) nas hifas de (A_1B_1).

micélio secundário diploïdizante seja tomado à extrema direita, quer à extrema esquerda. Logo a diploïdização não pode ser obra de núcleos livres do micélio secundário, núcleos que de resto a simples observação citológica dos micélios secundários nos fazia prever que seriam pura imaginação. Os novos dicários formam-se por associação de núcleos do micélio primário com outros núcleos compatíveis vindos do micélio secundário e que faziam parte de dicários.

Os dois elementos do dicárion não estão pois indissolùvelmente ligados e podem, em certos casos, separar-se de novo ou dividir-se independentemente um do outro.

Êste estudo das confrontações recíprocas pôs-nos, por outro lado, sôbre a pista de um fenómeno extremamente interessante.

Admite-se geralmente que os factores que determinam os fenómenos de compatibilidade e incompatibilidade actuam provocando uma espécie de repulsão entre núcleos, e por conseqüência

entre micélios, que possuem um factor comum. Compreende-se por isso perfeitamente que quando, em uma confrontação, só um dos tipos de núcleos do micélio secundário é compatível com os núcleos do micélio primário, seja êsse tipo que passa para o micélio primário afim de o diploïdizar. Mas se os dois tipos de núcleos dos dicários do micélio secundário são ambos compatíveis com os núcleos do micélio primário o que seria lógico esperar era que, quando se repete muitas vezes uma mesma confrontação, (ab / AB + + A_1 B_1) por exemplo, os núcleos (ab) do micélio primário emparelhassem umas vezes com (AB) outras vezes com (A_1 B_1). Mais ainda; pois que na mesma confrontação se realizam, no ponto de contacto dos dois micélios, centenas de anastomoses entre as hifas de um e outro, nada mais natural que em umas anastomoses passasse o núcleo (AB) e em outras o núcleo (A_1 B_1), de acôrdo com as suas respectivas posições em relação aos núcleos do micélio primário, no momento de se dar a anastomose; o que acarretaria como conseqüência que, após a diploïdização, certas regiões do micélio diploïdizado teriam dicários (ab + AB) e outras regiões, dicários (ab + A_1 B_1).

A experiência prova, porém, que nada disto acontece. Em uma mesma confrontação o micélio primário, após a diploïdização, tem, como já vimos, uma constituïção genética perfeitamente homogénea; e quando se repete muitas vezes uma dada confrontação os resultados são sempre os mesmos. Tudo se passa como se os núcleos do micélio primário exercessem uma selecção sôbre os núcleos do micélio secundário e atraíssem os de um tipo mais enèrgicamente que os do outro tipo.

Quando trabalhamos com séries alèlomórficas de factores de esterilidade de diferentes raças geográficas, o método das confrontações compatíveis permite-nos medir as intensidades relativas das atracções entre os diferentes tipos de núcleos, como se dispuzéssemos de um dinamómetro ou de uma balança de Coulomb. Uma vez isto feito é possível prever, para confrontações ainda não realizadas, qual será o núcleo do micélio secundário que irá associar-se com os do micélio primário.

Os factores de esterilidade devem ter pois uma dupla função. A presença de um factor comum provoca, entre dois núcleos, uma repulsão, mais inérgica para os do par (Aa) que para (Bb). Para a série (Bb) vimos ainda que esta repulsão é fraca pouco depois

da germinação dos esporos e se vai acentuando progressivamente à medida que os micélios vão envelhecendo. Por outro lado os fenómenos de selecção nuclear são susceptíveis de explicar-se por uma atracção entre os núcleos possuindo factores diferentes da série (Aa).

É possível, após a determinação das intensidades relativas das atracções entre núcleos com factores diferentes da série (Aa), atribuir a êstes factores uma *valência*, expressa por um valor numérico arbitrário, como se êsses factores representassem um conjunto de pontos ordenados ao longo de uma recta; as atracções entre dois factores (A) e (a) serão tanto mais fortes quanto maior fôr a sua distância sôbre a recta, ou a diferença das suas valências.

Uma vez feita esta determinação das valências dos factores, em face dos resultados de uma primeira série de confrontações, é possível prever os resultados de tôdas as outras ainda não efectuadas.

b) *As confrontações incompatíveis*

A técnica empregada para o estudo das confrontações compatíveis, de marcar os núcleos dos dois micélios com génes de referência diferentes, não pode empregar-se para as confrontações incompatíveis, pois nestas, por definição, cada um dos núcleos dos dicários diploïdizantes (Ab + aB) há-de ter necessàriamente um factor comum com os núcleos (AB) do micélio primário. De modo que, se na descendência dos chapéus obtidos sôbre o micélio (AB), após a sua diploïdização, se verificar a existência dos quatro grupos (AB, ab, Ab, aB), como já o próprio BULLER havia feito, isso apenas nos permite eliminar a hipótese de uma diploïdização por copulação ilegítima de (AB) com um dos núcleos (Ab ou aB) do micélio secundário. Mas continuamos sem saber se os dicários do micélio diploïdizado tinham a constituïção (Ab + aB), e eram por conseqüência os do micélio diploïdizante, ou a constituïção (AB + ab), e eram o resultado da associação de um núcleo (AB) do micélio primário com um outro (ab) oriundo do micélio secundário. E esta é que é afinal a questão que é preciso resolver.

Suponhamos a confrontação incompatível (AB / Ab + aB) (fig. 13) e representemos os novos dicários formados sôbre o micélio primário pela fórmula (x + y). Se na descendência dêste

micélio se encontram os quatro grupos «sexuais» é porque da cariogamia de (x) com (y) resultou um núcleo (Aa, Bb). Logo,

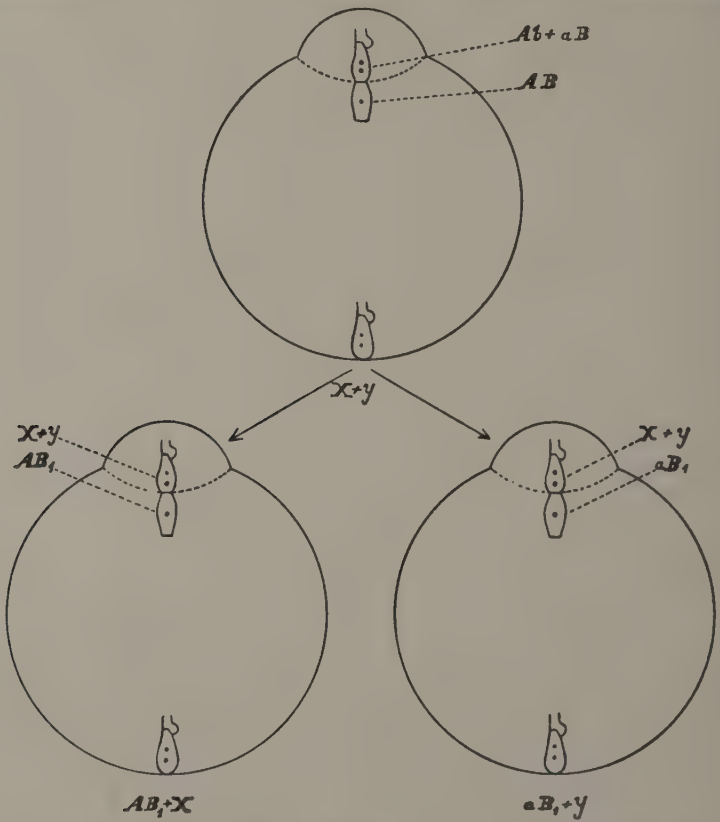


Fig. 13 — Na confrontação incompatível (AB / Ab + aB), obtem-se, após a diploïdizacão do micélio primário (AB), novos dicários (x+y). Se nestes dicários o núcleo (x) fôr portador de (a) e o núcleo (y) de (A), as duas confronrações sucessivas do micélio secundário (x+y) com dois micélios primários (AB1) e (aB1) serão ambas compatíveis e permitirão separar (x) de (y), com formação de dois novos micélios secundárias (AB+x) e (aB1+y). A análise genética de frutificações desenvolvidas sôbre cada um dêstes dois micélios dá imediatamente a constituïção de (x) e (y).

um dos núcleos, (x) por exemplo, possuírá o factor (a) associado ou a (B) ou a (b); e o outro núcleo (y) será portador de (A) associado a (b) ou (B). Para conhecer a constituïção do dicárion

(x + y) basta separar os seus dois núcleos *antes da cariogamia*. Ora esta separação é muito simples, uma vez que nós já sabemos, pelo estudo das confrontações compatíveis, o que é necessário fazer para arrancar a um dicárion o núcleo que desejamos.

Com efeito, se confrontarmos o micélio secundário (x + y) sucessivamente com dois micélios primários (AB_1) e (aB_1), isto é, dois micélios escolhidos de tal modo que cada um possua um factor comum (A ou a) com cada um dos núcleos (x e y), associados a um factor da série (Bb) diferente de (B) e de (b), conseguiremos com a maior facilidade separar os dois elementos do dicárion. Na verdade se, como supusemos, (y) contém (A) e (x) contém (a) os resultados das duas confrontações não podem deixar de ser:

$$AB_1 / x + y = AB_1 + x$$
$$aB_1 / x + y = aB_1 + y$$

pois que (y) é incompatível com (AB_1), por comunidade de (A), e (x) é incompatível com (aB_1), por comunidade de (a).

Por êste processo obtemos dois novos micélios secundários, um contendo (x), outro contendo (y), mas associados, em cada caso, a núcleos de constituïção genética conhecida. Por conseqüência, para conhecer (x) e (y) basta deixar frutificar cada um dêstes micélios secundários e proceder à análise genética da sua descendência.

Feito isto chegou-se à seguinte conclusão:

$$x = ab \quad y = AB \quad (x + y) = (ab + AB)$$

Quer dizer, na confrontação incompatível

$$AB / Ab + aB = ab + AB$$

os novos dicárions, formados sôbre o micélio primário, não são os do micélio diploïdizante (Ab + aB), como supunham RAWITSCHER, DICKSON e outros que do caso se haviam ocupado; êstes novos dicárions têem a constituïção (ab + AB) e não podem deixar de ter sido formados por associação de núcleos do micélio primário (AB) com outros (ab) vindos do micélio secundário.

Mas como pode um micélio secundário de constituïção (Ab + + aB), obtido pelo cruzamento de (Ab) com (aB), fornecer um núcleo (ab) que êle não possui?

A origem dêste núcleo (ab) constitui um problema e na

verdade um problema importantíssimo. Mas não confundamos duas coisas distintas na sua essência. Uma é a verificação de um facto, isto é, de que em uma confrontação incompatível (AB / Ab + aB) os novos dicários, formados sôbre o micélio primário, têem a constituïção (ab + AB); outra são as hipóteses que nos permitem explicar a formação dêstes dicários e a origem do núcleo (ab).

Que os novos dicários têem a constituïção genética que lhe atribuímos, e não são por conseqüência os do micélio diploïdizante, como supunha RAWITSCHER, é um facto seguramente averiguado e que ninguém, cremos nós, pode pôr em dúvida; a não ser que se encontre uma outra interpretação para os resultados das nossas experiências...

Quanto à origem do núcleo (ab) não temos para apresentar senão hipóteses, mais ou menos verosímeis, com as quais cada um pode concordar ou não; e, neste último caso, procurar outras explicações mais razoáveis.

Se após uma confrontação incompatível (AB / Ab + aB) foi possível dissociar os dicários formados sôbre o micélio primário e mostrar que os dois elementos que entravam na sua constituïção eram respectivamente (AB) e (ab) é evidente que os núcleos (AB) hão-de ser os do micélio primário, os únicos dos três tipos de núcleos existentes nos dois micélios antes da confrontação, que tinham essa constituïção. Quanto aos núcleos (ab) o mais razoável é admitir que provêem do micélio secundário diploïdizante; e como êles não existiam lá antes da confrontação, é natural que se tenham formado quando os dois micélios se anastomozaram. Mas como poderia formar-se sôbre um micélio (Ab + aB) um núcleo (ab)?

Uma explicação consistiria em admitir a existência de uma mutação. No momento em que os dois núcleos do micélio secundário se encontram em presença dos núcleos do micélio primário, com os quais são incompatíveis, em um núcleo (Ab, p. ex.) do micélio diploïdizante, ter-se-ia dado uma mutação de (A) em (a) e daí teria resultado o núcleo (ab).

É verosímil uma tal hipótese?

A mutabilidade expontânea dêstes factores de esterilidade é diminuta, certamente inferior a 0,1 %. A percentagem de confrontações incompatíveis em que se obtem uma diploïdização do micélio primário é superior a 30 %. Teríamos pois que admitir que a simples presença de um núcleo de constituïção (AB) em face dos

dois núcleos (Ab + aB) de um dicárion do micélio secundário é susceptível de aumentar a probabilidade de mutação de um factor de esterilidade de mais de trezentas vezes. Acresce ainda que, para que (Ab) mute em (ab) não basta a presença do núcleo (AB) do micélio primário, pois que tôdas as vezes que confrontamos os mesmos dois micélios, (Ab) e (AB), obtemos uma reacção nitidamente negativa; para que a suposta mutação se realize é indispensável que o núcleo (Ab), não só esteja em presença de um núcleo (AB), mas faça já parte de um dicárion de constituïção (Ab + aB). E não é tudo.

Com efeito, para cada par de factores de esterilidade conhece-se uma série enorme de alèlomorfos. Se o factor (A) sofre uma mutação esta pode teòricamente recaír em qualquer dos alèlomorfos da série, representados nas outras raças geográficas conhecidas. Pois bem; da pretensa mutação de (A) o que resulta é precisamente o outro factor (a) da mesma raça geográfica e que já existia no outro núcleo (aB) dos dicárions (Ab + aB) do micélio secundário!

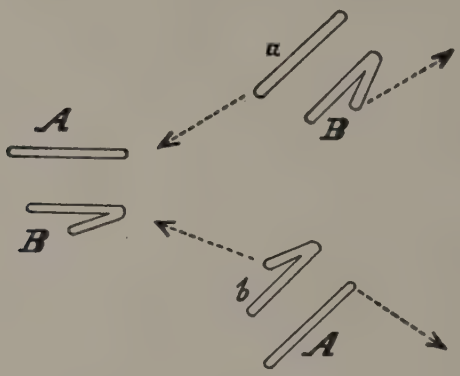
Quere dizer, no caso em discussão, não se trataria de uma mutação espontânea mas sim de uma mutação provocada experimentalmente e por um agente inteiramente diferente daqueles que sabemos que provocam tais mutações. E não só de uma mutação espontânea, mas ainda de uma mutação dirigida, pois que nos é possível prever qual o mutante que vamos obter!

A qualquer que tenha seguido os progressos recentes do estudo experimental das mutações, o grau de verosimilhança de qualquer destas hipóteses, consideradas separadamente, afigurar-se-á extremamente reduzido. A possibilidade da sua coexistência parece-nos já do domínio da pura fantasia.

Mas se rejeitarmos por inverosímil a hipótese mutacional, não será possível explicar a existência demonstrada dêste famoso núcleo (ab)?

A explicação que nos parece mais razoável do aparecimento súbito de um núcleo de constituïção (ab), em um micélio secundário (Ab + aB), é a de uma troca de cromosomas entre os dois núcleos do dicárion. Com efeito, os dois factores que nós vamos encontrar reünidos no mesmo núcleo (ab) após a diploïdização, existiam já ambos nos dicárions do micélio secundário (Ab + aB) antes da confrontação; simplesmente estavam localizados em dois

núcleos diferentes da mesma célula. Ora êstes núcleos multiplicam-se por divisões conjugadas em que os dois fusos se colocam em geral paralelamente e muito próximos um do outro, dada a diminuta



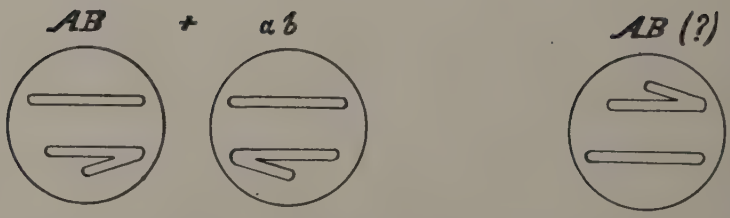


Fig. 14 — Em uma confrontação incompatível (AB / Ab + aB) pode formar-se, no micélio secundário (Ab + aB), um novo núcleo (ab) à custa de cromosomas oriundos dos dois núcleos de um dicárion do micélio secundário, graças à presença do núcleo (AB) do micélio primário.

espessura das hifas. No fim da anafase (fig. 14), antes que se formem as novas membranas nucleares, os cromosomas encontram-se livres no seio do plasma e muito próximos uns dos outros. Neste momento a presença na vizinhança de um núcleo (AB), em que o factor (A) exerce uma repulsão sôbre o cromosoma portador de (A) do núcleo (Ab) e uma atracção sôbre o cromosoma portador

de (a) do núcleo (aB), do mesmo modo que o factor (B) repele (B) de (aB) e atrai (b) de (Ab), uma troca de cromosomas entre os dois núcleos seria possível com formação de um novo núcleo (ab).

Seria suficiente que, nas centenas de anastomoses que se formam entre os dois micélios no momento da confrontação, êste fenómeno se passasse uma vez para que o micélio primário fôsse diploïdizado. A dificuldade de se obterem diploïdizações entre micélios incompatíveis, a lentidão com que elas progridem, a irregularidade com que aparecem as manchas de micélio secundário sôbre o antigo micélio primário, tudo isso são argumentos, são indícios a favor da nossa explicação.

Emquanto numa confrontação compatível o micélio primário é invadido ao mesmo tempo por centenas de núcleos vindos do micélio secundário, pois que a cada anastomose deve corresponder a formação de um novo dicárion, nas confrontações incompatíveis a diploïdização, quando se consegue, deve ser obra de um único núcleo, cujos descendentes não só levarão mais tempo a atingir a periferia do micélio primário mas terão sôbre esta uma distribuïção necessàriamente menos regular.

Seja porém qual fôr a explicação que novas pesquizas impuzerem para êste fenómeno uma coisa se nos afigura indiscutìvelmente demonstrada: que nas confrontações incompatíveis os novos dicárions não são os do micélio diploïdizante, mas sim outros novos, formados por associação de um núcleo do micélio primário com outro oriundo do micélio secundário e que lá não existia antes da confrontação.

Já depois de publicados os resultados dos nossos trabalhos e com conhecimento dêles, pois que os cita na bibliografia, apareceu sôbre êste assunto uma curta nota de um botânico japonês, OIKAWA (39). O autor trabalhou com uma espécie bipolar, *Stropharia semiglobata*, e uma outra tètrapolar, *Galera tenera*, e em ambos os casos empregou para o estudo das confrontações compatíveis o nosso método de marcar os núcleos com factores de esterilidade de diferentes raças geográficas. O estudo da descendência das frutificações obtidas sôbre o micélio diploïdizado, feito sem análise de tétradas, conduziu-o exactamente às nossas conclusões: Nas confrontações compatíveis os carpóforos não são quimeras; os núcleos do micélio primário tomam parte na formação dos novos dicárions e associam-se com núcleos vindos do micélio secundário

(uma única excepção a esta lei, em que a diploïdização se fez por migração dos dicários do micélio diploïdizante, exactamente como no nosso trabalho); os micélios diploïdizados são genèticamente homogéneos e a diploïdização faz-se por migração de um só tipo de núcleos do micélio secundário para o micélio primário (uma única excepção também, em que sôbre o micélio primário se encontraram dois tipos de dicários, formados por associação dos núcleos do micélio primário ora com um, ora com outro dos dois tipos de núcleos do micélio secundário).

O autor não se ocupou do mecanismo de diploïdização nas confrontações incompatíveis. Mas na introdução ao seu trabalho escreve textualmente o seguinte: «In 1930 BULLER published his first report on the diploidisation of a haploid mycelium by a diploid mycelium. Since then this interesting subject has been studied by DICKSON, QUINTANILHA, and others. But the most important problems in connection with this phenomenon still remain unsolved.»

Ainda bem que OIKAWA resolveu interessar-se pelo assunto lançando, com as suas pesquisas uma nova luz sôbre êstes interessantes problemas que os anteriores investigadores tinham deixado sem solução!

INTERPRETAÇÃO TEÓRICA DA SEXUALIDADE NOS FUNGOS

Quási todos os trabalhos que até agora realizámos foram delineados e levados a cabo com um duplo objectivo. Por um lado precisar e alargar os nossos conhecimentos sôbre os fenómenos biológicos que estudámos, e por outro lado, procurar uma interpretação teórica dos resultados adquiridos. Ora, de todos os problemas que nos interessaram aquele que tinha um maior alcance filosófico e ficou por isso no centro das nossas preocupações, era o problema da interpretação da pluripolaridade sexual.

É certo que as nossas concepções sôbre a natureza da sexualidade se modificaram profundamente através dos tempos, à medida que íamos alargando o domínio dos nossos conhecimentos a grupos de seres vivos cada vez mais afastados dos animais superiores. Mas a noção de bipolaridade sexual permaneceu inabalável.

O problema só se pôs quando se descobriu a tètrapolaridade dos Basidiomicetos. Nas espécies tètrapolares tudo se passava como se existissem, não dois, mas quatro sexos diferentes, condicionados

por dois pares de factores mendelianos independentes. A descoberta de raças geográficas diferentes e interférteis veio, a breve trecho, mostrar que, mesmo para as espécies bipolares, tudo se passava como se o número de sexos fôsse ilimitado, pois que os sexos complementares de cada raça geográfica eram diferentes dos sexos das outras raças.

Em face dos novos factos duas atitudes eram possíveis: Ou conservar intacta a noção de bipolaridade sexual e procurar uma outra explicação para os fenómenos de pretensa sexualidade dos Basidiomicetos; ou admitir que o caso vulgar, da existência de dois sexos apenas, não é senão um caso particular de um fenómeno mais geral, a sexualidade pluripolar.

A grande maioria dos biologistas que do problema se ocuparam enveredou pelo primeiro caminho e procurou em diferentes direcções uma interpretação teórica da pluripolaridade sexual. Mas o que em cada uma destas tentativas transparecia claramente era o desejo de manter intacta a clássica concepção de bipolaridade sexual. Nós admitíamos, pelo contrário, a possibilidade de ter de abandonar um dia, por insuficiente, êsse conceito, se a descoberta de novos factos nos impusesse uma nova doutrina da sexualidade baseada na noção de pluripolaridade. Assim a nossa atitude neste campo foi de comêço essencialmente demolidora. Aplicámo-nos a demonstrar, para cada uma dessas tentativas de interpretação, que os Basidiomicetos tinham sido metidos à fôrça dentro do sistema e aí ficavam, como o gato escondido debaixo da cama, com o rabo de fora. Fômos puxando pelo rabo sucessivamente a todos os gatos que encontrámos nesta postura; e as doutrinas, cujo desacôrdo com os factos se ia tornando manifesto, iam sendo abandonadas pelos seus próprios autores.

Não interessa repetir aqui a exposição das sucessivas interpretações da sexualidade multipolar e das críticas que lhes fizemos, baseadas nos resultados dos nossos trabalhos. Mas é-nos grato recordar que foram em geral as nossas críticas que levaram ao abandono, uma após outra, dessas interpretações.

Nesta primeira fase da nossa actividade devemos ter deixado muitas vezes ao leitor a impressão de defendermos a doutrina da pluripolaridade sexual, precisamente porque impugnávamos tôdas as tentativas de interpretação tendentes a conservar de pé o princípio da bipolaridade. No fundo, porém, o que tomámos foi uma

atitude crítica e objectiva. Na investigação científica quando os factos estão manifestamente em desacôrdo com as doutrinas é necessário ter a coragem de o afirmar e não procurar torcer os factos para os encaixar à fôrça em uma gaveta das nossas concepções teóricas; e procurar uma nova teoria susceptível de explicar os velhos e os novos factos.

A nossa atitude neste campo só começou a ser construtiva quando um conjunto de novos resultados, obtidos por diferentes investigadores, trabalhando com materiais os mais diversos, permitiu uma visão clara dos factos e uma interpretação coerente.

Que resultados foram êstes?

Por um lado nós pudemos demonstrar que a incompatibilidade entre micélios com um factor comum da série (Bb) pode ser vencida, e os respectivos núcleos, não complementares, forçados a uma cariogamia normal.

Por outro lado MOEWUS, trabalhando com espécies de dioicas de *Chlamydomonas*, mostrou que o sexo é ali determinado por factores mendelianos; que para cada sexo existe uma série alèlomórfica de factores de valência diferente; e que é possível obter copulações normais entre indivíduos do mesmo sexo, desde que os seus núcleos sejam portadores de factores de sexualidade de valência suficientemente diferente.

Êstes dois grupos de resultados permitiram-nos tirar a conclusão de que, do grau de incompatibilidade entre núcleos possuindo um factor comum não é possível tirar quaisquer conclusões sôbre a natureza dêsses factores. Por outras palavras, êste grau de incompatibilidade não permite o estabelecimento de um critério de distinção entre factores de sexualidade e factores de esterilidade, como alguns tinham pretendido.

Finalmente o estudo da sexualidade dos Ascomicetos, e mais particularmente os trabalhos de B. O. DODGE e seus discípulos, mostraram que em certas espécies havia micélios monóicos, providos de órgãos masculinos e femininos, mas estéreis; que o cruzamento dêstes micélios monospóricos e monóicos em tôdas as combinações possíveis, permitia reparti-los em dois grupos interférteis mas intra-estéreis; que êstes fenómenos de incompatibilidade eram condicionados pela existência de um par de factores mendelianos, factores que, tratando-se de organismos monóicos, com órgãos

masculinos e femininos, não podem deixar de ser considerados como factores de esterilidade.

Há por conseqüência organismos onde a sexualidade se manifesta na fase haplóide e que são portadores de factores de esterilidade; êsses factores não exercem qualquer influência sôbre o desenvolvimento dos órgãos sexuais mas provocam o aparecimento de fenómenos de incompatibilidade bipolar.

A incompatibilidade aqui não resulta, como no caso das plantas

			A ♂ + 1	a ♂ + 2
A	♂ +	1	—	+
a	♂ +	2	+	—

Quadro VII

Heterotalismo bipolar provocado pela presença de um par de factores hereditários de esterilidade em formas monóicas de Ascomicetos.

superiores portadoras de factores de esterilidade, de uma impossibilidade de desenvolvimento da fase haplóide, o tubo polínico, sôbre tecidos da fase diplóide; mas de uma repulsão entre células da mesma fase e de sexo diferente, portadoras de um factor mendeliano comum.

Foram êstes os resultados mais importantes que nos permitiram uma interpretação da sexualidade dos Basidiomicetos em um quadro geral da sexualidade dos outros organismos.

Nos actuais Basidiomicetos já não existem órgãos sexuais. Consideramo-los *potencialmente monóicos*. As espécies onde não existem factores de esterilidade conduzem-se como homotálicas; aquelas onde se desenvolveu, provàvelmente por mutação, um par de factores de esterilidade são heterotálicas bipolares; finalmente as espécies bipolares onde ulteriormente se desenvolveu um segundo par de factores de esterilidade, conduzem-se como tètrapolares. Em umas e outras, mutações sucessivas dos factores de esterilidade devem ter originado as séries alèlomórficas que conduziram ao aparecimento das actuais raças geográficas.

Mas, objectar-me-á o leitor, isso não é novo! É a velha inter-

pretação de PRELL (21) depois adoptada e defendida por BRUNSWIK (24), v. WETTSTEIN e outros. É certo. Mas não é menos certo que, a princípio, esta interpretação assentava sôbre uma pretensa analogia entre dois tipos de fenómenos fundamentalmente diferentes, a paraesterilidade das plantas superiores e dos Basidiomicetos; nestes a sexualidade manifesta-se na fase haplóide, naquelas na fase diplóide; nos Basidiomicetos a paraesterilidade é a conseqüência de uma repulsão entre células da mesma fase possuindo um factor comum de incompatibilidade; nas plantas superiores a paraesterilidade é o resultado, como já dissemos, da impossibilidade do grânulo de pólen germinar, ou do tubo polínico se desenvolver, sôbre o tecido diplóide do estigma, desde que êste possua, em comum com o grânulo de pólen, um factor comum de esterilidade.

Só depois da descoberta dos fenómenos de paraesterilidade dos Ascomicetos é que a interpretação da pluripolaridade sexual dos Basidiomicetos, pelo jogo de séries alèlomórficas de factores mendelianos de esterilidade, passou a ter uma base científica. Os seus autores tiveram talvez uma previsão dos acontecimentos. Mas perfeitamente justificada nos parece ainda hoje a atitude daqueles que, como nós, mantiveram durante anos uma atitude crítica em face desta interpretação, até que um novo conjunto de descobertas veio impôr a sua aceitação.

A GENÉTICA DOS HIMENOMICETOS NAS SUAS RELAÇÕES COM A SISTEMÁTICA

Até começos do século XIX a sistemática assentava em bases essencialmente morfológicas. Os naturalistas verificaram a descontinuïdade do mundo orgânico. A noção de espécie, que desta verificação resultou e correspondia a uma realidade palpável, foi-se radicando cada vez mais profundamente no espírito dos botânicos e zoólogos. Admitia-se que as espécies animais e vegetais que povoam o nosso globo eram entidades criadas *ab initio*, nìtidamente separadas umas das outras, fixas e imutáveis. O papel do naturalista consistia pois em encontrar os limites naturais que separavam as espécies. O problema não oferecia dificuldades de caracter teórico e devia ter sempre uma solução; pràticamente, as soluções encontradas podiam aproximar-se mais ou menos da

realidade, conforme os dotes naturais, o «faro» sistemático de cada naturalista.

Com o alvorecer do novo século e o desenvolvimento progressivo das ideias evolucionistas o problema tomou pouco a pouco um aspecto diferente. A cada período da idade da terra correspondem uma fauna e uma flora características. Para grande número das espécies actuais podemos dizer com relativa segurança em que época apareceram. As espécies não são pois entidades fixas e imutáveis; as actuais provêem de outras prèexistentes por sucessivas transformações.

A noção de hierarquia dos grupos sistemáticos, anterior à época evolucionista, adquire agora um novo sentido, o de parentesco mais ou menos próximo entre espécies do mesmo género, géneros da mesma família, etc. Mas do mesmo passo complica-se consideràvelmente o papel do naturalista.

As espécies actuais, como as que as precederam à superfície da terra, encontram-se em permanente transformação. Se algumas conseguem, durante períodos relativamente muito grandes, manter-se inalteradas, é que tôdas as transformações que se produziram, menos aptas que o tipo, foram sendo eliminadas na luta pela vida; mas mil outras espécies se encontram em cada período em plena evolução, produzindo novas raças, novas variedades, fragmentando-se pouco a pouco em novas espécies. Para estas o papel do sistemático torna-se de uma extrema dificuldade. Já se não trata de encontrar os limites naturais de conjuntos nìtidamente separados por barreiras inalteráveis; mas de marcar o momento, em um processo evolutivo, a partir do qual dois conjuntos de indivíduos deixam de fazer parte da mesma espécie e passam a constituir duas espécies diferentes.

Terá êste problema sempre solução?

Os sistemáticos procuraram resolvê-lo com métodos puramente morfológicos. Mas a breve trecho se tornou evidente que tais critérios não podem deixar de ser essencialmente subjectivos. Nos casos difíceis os melhores especialistas estão a cada passo em desacôrdo sôbre a maneira de conceber e delimitar tal ou tal espécie.

O facto tornou-se-nos particularmente palpável durante os últimos anos, em que estivemos em estreito contacto com os naturalistas do «Muséum d'Histoire Naturelle de Paris», ali recebemos,

das mais variadas origens, centenas de amostras de esporos de Himenomicetos, para o estudo da sua conduta sexual, e percorremos a bibliografia que ao assunto se refere. A cada momento nos apercebíamos que diferentes autores tinham estudado, sob o mesmo nome, espécies certamente diferentes; ou que dois ou mais naturalistas, e dos mais competentes, nos enviavam, sob o mesmo nome, esporos que com certeza não pertenciam à mesma espécie.

Nunca nos tínhamos ocupado de problemas de sistemática, convencidos como estávamos, e estamos ainda, da nossa falta de dotes naturais para êsse género de estudos. Mas à medida que as nossas investigações se iam estendendo a um número de espécies cada vez maior ia-se pondo no nosso espírito o problema de saber até que ponto os nossos trabalhos poderiam ser aproveitados, do ponto de vista sistemático, para uma mais rigorosa e mais objectiva delimitação das espécies; e, por outro lado, se não seria possível aproveitar êste imenso material para o estudo do mecanismo do isolamento das raças, de onde mais tarde hão-de sair as espécies que actualmente se estão formando.

Foi sobretudo nos últimos dois anos do nosso estágio em Paris, de 1939 a 1941, que atacámos êste problema, em colaboração, por um lado, com M.e QUINTANILHA e M.le VASSERMANIS, e, por outro lado, com os naturalistas do «Muséum d'Histoire Naturelle», M. ROGER HEIM, sub-director do «Laboratoire de Cryptogamie», e M. H. ROMAGNESI, que amàvelmente se encarregaram da parte sistemática do trabalho.

Mais de quatrocentas espécies de Himenomicetos, na sua grande maioria Agaricáceas, foram semeadas, e foi-nos possível obter culturas puras de perto de duzentas espécies. Aquelas cujos esporos germinavam eram estudadas morfològicamente pelos naturalistas do Muséum, ao mesmo tempo que o nosso grupo estudava a germinabilidade dos esporos e aspecto dos micélios primários e secundários, em diferentes meios de cultura, presença ou ausência de ansas de anastomoses e de oídios, conduta sexual, capacidade de frutificação em cultura artificial, etc., etc.

Por êste processo pudemos obter, para espécies tão rigorosamente determinadas quanto possível, um precioso complemento de informação aos caracteres até então utilizados pelos sistemáticos; complemento tanto mais para apreciar quanto é certo que o número de caracteres de que até agora tem sido possível lançar mão, na

sistemática dos Himenomicetos, é bastante reduzido; e por outro lado parece ser bastante considerável a amplitude de variabilidade de alguns dêstes caracteres.

Para espécies próximas e difíceis de distinguir o conhecimento dêste novo conjunto de caracteres podia ser um elemento valiosíssimo para a sua identificação. Assim por exemplo, ficava-se sabendo que a espécie que Fulano descreveu e estudou sob tal nome, possui, além dos caracteres que serviram para o estabelecimento da sua diagnose, mais os seguintes: os seus esporos germinam todos no meio A, mas não germinam nos meios B e C; os seus micélios primários são desprovidos de ansas e produzem grande quantidade de oídios, bem como um micélio aério abundante e completamente branco, mas não passam nunca espontâneamente ao estado de micélio secundário; as culturas polispóricas produzem um micélio secundário com ansas grandes e fáceis de ver, mesmo com pequenas ampliações; pelo estudo dos cruzamentos das culturas monospóricas verificou-se que a espécie é heterotálica tètrapolar, dando cruzamentos perfeitamente regulares, sem copulações ilegítimas nem falhas nas confrontações positivas; a espécie frutifica em cultura sôbre tais e tais meios, em tais condições de temperatura, iluminação, etc. e em tal época do ano.

Quando o número de espécies cultivadas do mesmo género começou a ser considerável iniciámos em larga escala experiências de cruzamentos. Tivemos então ocasião de verificar o que já outros investigadores tinham observado, isto é, que nos Himenomicetos espécies diferentes são completamente inter-estéreis; emquanto raças geográficas da mesma espécie, idênticas morfològicamente, diferem umas das outras pelos seus factores de esterilidade, que se apresentam em séries alèlomórficas, como já vimos em um capítulo anterior. Tais factores de esterilidade porém, longe de diminuírem a fertilidade entre haplontes de raças geográficas diferentes, acrescem-na, pelo contrário, porquanto haplontes de duas raças geográficas, sem factores comuns de esterilidade, são interférteis em tôdas as combinações possíveis.

A verificação constante dêstes dois factos — impossibilidade de hibridação, mesmo entre espécies muito próximas, e interfertilidade de haplontes de raças geográficas diferentes da mesma espécie — sugeriu a aplicação sistemática de um novo critério para aqueles casos que os naturalistas eram incapazes de resolver pelos seus

meios habituais de trabalho. A saber: «Se haplontes de origens diferentes são interférteis devem pertencer à mesma espécie; se são interestéreis devem pertencer a espécies diferentes.»

A que resultados conduz a aplicação dêste critério?

Nos casos bem nítidos conduz a resultados absolutamente concordantes com as conclusões dos sistemáticos, isto é, só há cruzamentos positivos entre haplontes da mesma espécie; nos casos difíceis, diante dos quais os naturalistas se encontram indecisos, ou não há unanimidade de vistas sôbre a maneira de conceber e delimitar tais espécies, a aplicação do critério da interfertilidade permite orientar o trabalho dos sistemáticos e fornece uma base objectiva para a resolução dêstes problemas.

Sempre que haplontes de origens diferentes são interférteis as duas populações pertencem indiscutivelmente à mesma espécie; se entre uma e outra existem pequenas diferenças morfológicas estas ou são puramente fenotípicas, condicionadas por diferenças do meio, ou são genotipicamente determinadas, e, nesse caso, são da natureza e do grau de amplitude daquelas que se encontram normalmente em qualquer população heterozigótica com um tipo de reprodução sexuada. Para que as duas populações possam evolucionar em sentidos diferentes e ser o ponto de partida de duas futuras espécies é indispensável que se isolem uma da outra, que não possam continuar a cruzar-se, ou por terem áreas de distribuïção geogràficamente separadas, ou por se terem tornado entretanto interestéreis os seus haplontes.

Se há interesterilidade entre haplontes de origem diferente as respectivas populações já se encontram, de facto, isoladas umas das outras na natureza por esta barreira intransponível da incompatibilidade sexual. O conhecimento dêste facto permite agora ao naturalista fazer uma destrinça entre as diferenças que são meras variações individuais e aquelas a que é necessário atribuir um significado específico.

Até hoje nunca tivemos quaisquer divergências com os naturalistas que trabalham em colaboração comnosco. Sempre que nós afirmámos que tais e tais esporos produziram haplontes interestéreis os sistemáticos conseguiram encontrar os caracteres morfológicos que permitiam a distinção em espécies diferentes.

Dois exemplos apenas, que nos parecem típicos.

No antigo género *Hypholoma*, hoje incluído em parte no

género *Drosophila*, há um grupo de formas bastante discutido, o grupo *appendiculata*. Para alguns autores, *Drosophila appendiculata* (Fr. ex Bull.) Quél. e *D. Candolleana* (Fr.) Quél. são duas espécies diferentes; para outros *D. Candolleana* não é senão uma variedade de *D. appendiculata;* finalmente para outros tratar-se-ia de uma espécie muito polimorfa onde não haveria razão para separar mesmo uma variedade. M. ROMAGNESI, que estava convencido da homogeneidade específica do grupo, enviou-nos grande número de amostras de esporos de colheitas diferentes, de que guardou as respectivas frutificações para estudo. Os haplontes obtidos dêstes esporos repartem-se em dois grupos nitidamente interestéreis. Guiado por êstes resultados M. ROMAGNESI poude verificar que na verdade havia um grupo de caracteres morfológicos que permitia fazer dos dois grupos duas espécies distintas. Depois recebemos de M. HEIM duas outras amostras de esporos, de que êle infelizmente não guardou os respectivos chapéus, pertencendo a êste grupo; o confronto com os tests permitiu verificar a identidade de uma das espécies de M. HEIM com um dos grupos de M. ROMAGNESI, emquanto os haplontes da segunda espécie de M. HEIM eram interestéreis com todos os outros. Pode muito bem tratar-se de uma terceira espécie que tenha andado até agora confundida com as duas outras; ou de uma espécie de um grupo próximo que só o estudo dos caracteres microscópicos teria podido permitir a identificação rigorosa.

O segundo exemplo é ainda mais curioso. No mesmo género *Drosophila* o grupo a que M. ROMAGNESI chama *atomata-prona* parece ser extremamente complicado do ponto de vista sistemático. O estudo genético de mais de uma dúzia de amostras de esporos que nos enviou o nosso colaborador permitiu-nos estabelecer a existência de cinco grupos interestéreis; êstes resultados tornaram possível a M. ROMAGNESI a determinação, pelos seus caracteres morfológicos, de cinco espécies distintas, a saber: *Drosophila prona* (Fr.) Quél. sensu Ricken, non Lange; *D. prona* (Fr.) Quél. sensu Lange non Ricken; *D. atomata* (Fr.) Quél. sensu Lange; *D. trepida* (Fr.) Quél. *f. minor* Lange non Ricken; *D. subtilis* (Fr.) sensu Romagnesi. M. ROMAGNESI declarou-nos repetidas vezes que sem o nosso auxílio teria sido absolutamente impossível ver claro dentro dêste grupo. A monografia do género *Drosophila* que o nosso ilustre colega anda preparando há anos já, está agora sendo continuada em colaboração comnosco e será provàvelmente o primeiro trabalho

de sistemática nos fungos levado a cabo por cooperação entre sistemáticos e geneticistas.

Evidentemente êste critério da interesterilidade não tem nada de absoluto, nem pretende substituir-se aos outros critérios até agora empregados para a destrinça das espécies. O que êle nos permite é afirmar com tôda a segurança se duas ou mais populações se encontram ou não fisiològicamente separadas, isto é, se são interestéreis ou interférteis. A experiência mostrou *até agora* que populações que os sistemáticos consideram como pertencendo indiscutìvelmente à mesma espécie são sempre interférteis; emquanto para as populações interestéreis tem sido possível encontrar bases morfológicas para a sua diferenciação específica. É de esperar, porém, que de futuro venham a encontrar-se casos de populações já fisiològicamente separadas mas ainda não morfològicamente diferenciadas. VANDENDRIES (27) menciona um dêstes casos para o *Coprinus micaceus;* MOUNCE e MACRAE (38) um outro para o *Fomes pinicola* (*Ungulina marginata*); e BIGGS (37) um terceiro para o *Corticium coronilla.* Também no reino animal se tem encontrado casos de populações interestéreis mas impossíveis de distinguir pelos seus caracteres morfológicos.

Em resumo, a nós, geneticistas, compete verificar se duas ou mais populações são interférteis ou interestéreis; aos naturalistas porém, compete, em última análise, decidir se os caracteres morfológicos permitem fazer dessas populações uma só ou diferentes espécies.

Quanto ao mecanismo que determina nos Himenomicetos o isolamento fisiológico das estirpes é interessante notar que até agora só deparámos com uma modalidade, a interesterilidade resultante da incapacidade dos haplontes se conjugarem e produzirem micélios secundários. Emquanto nos outros grupos de organismos animais e vegetais o primeiro passo para o isolamento fisiológico das populações é representado pela infecundidade dos híbridos da primeira geração, aqui tal tipo de isolamento ainda não apareceu. Mesmo entre as mais próximas espécies, ou entre raças da mesma espécie impossíveis de distinguir morfològicamente, o isolamento começa pela incapacidade de produção de micélios secundários híbridos.

Que causas determinam esta indiferença dos haplontes uns para com os outros? Por ora não é possível dar a esta pregunta

uma resposta precisa. Sabemos que entre haplontes provenientes da mesma frutificação a indiferença ou a repulsão é conseqüência da presença de um ou dois factores comuns de esterilidade. Mas no caso da interesterilidade absoluta entre haplontes de origens diferentes as causas da indiferença dos micélios primários não podem ser as mesmas, porquanto nós sabemos, por um lado, que a presença de factores diferentes de esterilidade provoca uma fertilidade acrescida, e, por outro lado, que um haplonte qualquer de uma dada raça geográfica não pode ter factores comuns de esterilidade com todos os haplontes de outra, seja qual fôr a constituïção genética das duas raças.

As causas desta indiferença devem pois ser procuradas em outra direcção e são provàvelmente da mesma natureza daquelas que no reino animal e nas algas, por exemplo, determinam a falta de atracção quimiotática do gameta masculino pelo gameta feminino. Se a produção e secreção de substâncias capazes de produzir sôbre outros micélios uma atracção quimiotática, susceptível de provocar a dissolução das paredes celulares e a formação de anastomoses, é conseqüência da existência de genes específicos, isso é que por agora não podemos afirmar. Mas estamos convencidos que é nesta direcção que convém procurar a solução do problema.

* * *

Neste capítulo da genética nas suas relações com a sistemática, a maioria dos resultados obtidos estão ainda inéditos. Deles apenas publicámos uma pequena parte sob o título «La conduite sexuelle et la systématique des Hyménomycètes», em colaboração com M.e QUINTANILHA e M.le VASSERMANIS e com algumas notas aditivas de M. ROGER HEIM e M. ROMAGNESI. Foi um trabalho redigido a correr, em fins de Maio de 1940, já com o exército alemão a poucos quilómetros de Paris! Aí apareceram sucintamente os primeiros resultados obtidos, isto é, o estudo da conduta sexual de vinte e duas espécies de Agaricáceas e a contribuïção que o nosso trabalho pode dar para a resolução de problemas de sistemática que a essas espécies digam respeito. De Maio de 1940 a Setembro de 1941, data da nossa partida de Paris, conseguimos terminar o estudo da conduta sexual de outras vinte e três espécies, apesar da gravíssima situação material e moral que o país atravessava.

Damos junto a lista completa das espécies cujo estudo se pode

considerar terminado. Os esporos provêem na sua grande maioria de colheitas do nosso presado colega M. ROMAGNESI, a quem estamos infinitamente reconhecidos pela preciosa colaboração que nos tem prestado na parte de sistemática. Algumas espécies não puderam ainda ser rigorosamente determinadas, outras têem uma determinação, sujeita a futuras correcções; de algumas foram analizados esporos de origens diferentes.

Lista das espécies de que já está concluído o estudo do comportamento sexual

Género Espécie	Homo-tálica	Hetero-tálica	Bipo-lar	Tètra-polar
Agrocybe dura (Fr. ex Bolt.)		—		—
» *semiorbicularis* (Fr. ex Bull.) Fay. .		—	—	
» *sphaleromorpha* (Fr. ex Bull.) sensu Quél., non Bres. nec Rick. . . .		—	—	
Coprinus auricomus Pat. sensu Kühner et Josserand		—		—
Coprinus Boudieri Quél.		—	—	
» *ephemerus* Fr. ex Bull. (F. tetraspórica)		—	—	
Coprinus erethistes Heim (inédito)		—		—
» *extinctorius* Fr. ex Bull. sensu Quél. non Rick.		—		—
Coprinus funariarum Métrod		—		—
» *hiascens* Fr. sensu Lange		—	—	
» » (F. macróspora) (idêntico ao anterior)		—	—	
Coprinus plagioporus Romagn. (inédito) . . .	—			
» *radians* (Desm.) Fr. (?)		—		—
» *radiatus* (Bolt.) Fr. sensu Lange (idêntico ao nosso *C. fimentarius*) . .		—		—
Coprinus sterquilinus Fr.	—			
Deconica crobula (Fr.) Romagn.		—	—	
» *inquilina* (Fr.) Pat.		—		—
Drosophila appendiculata (Fr. ex Bull.) Quél. (stirpe n.º 25)		—		—
Drosophila appendiculata (st. 20, 84, 108, 384, 390; diferentes de 25)		—		—
Drosophila Candolleana (Fr) Quél. (st. 202) .		—		—
» *exalbicans* Romagn. (inédito) . . .		—		—
» *fibrillosa* (Fr. ex Pers.) Quél. . . .		—		—
» *gracilis* (Fr. ex Pers.) Quél. (st. 171, Leg. Heim)		—		—

Lista das espécies de que já está concluído o estudo do comportamento sexual

Género · Espécie	Homo-tálica	Hetero-tálica	Bipo-lar	Tétra-polar
Drosophila gracilis sensu Konrad e Maublanc (st. 215, difer. de 171, Leg. Romagn.)		—	—(?)	
Drosophila marcescibilis (Britz.) Romagn. . .		—		—
» *subatrata* (Fr. ex Bats.) Quél. (St. 43 e 284)		—	—	
Drosophila prona (Fr.) Quél. sensu Rick. non Lange		—		—
Drosophila prona (Fr.) Quél. sensu Lange non Rick.		—		—
» *badia* Romagn. (inédito) (st. 242 e 341)		—		—
Drosophila sp. (gr. caudata, st. 244)		—	—	
» *trepida* (Fr.) Quél. (F. minor) Lange, non Rick. (st. 247 e 248) . . .		—		—(?)
Drosophila subtilis (Fr.) sensu Romagn. . . .		—		—
» *caudata* (Fr.) sensu Rick., nec al. (non Bres. nec Métrod, etc.) . . .		—		—
Drosophila virginea (Lange) Romagn.		—	—	
» *atomata* (Fr.) Quél. sensu Lange non Rick.		—	—(?)	
Drosophila semivestita (Bk) sensu Ricken . .		—	—	
» sp. (st. 282)		—		—
» sp. (gr. infida, st. 331)		—		—(?)
Flammula carbonaria Fr.		—		—
Lentinus tigrinus Fr. ex Bull.		—		—
Panaeolina foenisecii (Fr. ex Pers.) Maire . .		—		—(?)
Panaeolus retirugis Fr. (st. 18)		—	—(?)	
» » (st. 222, dif. de 18?) . .		—		—
Pseudocoprinus disseminatus (Fr. ex Pers.) Kükner		—	—	
Stropharia merdaria Fr.		—	—	

Independentemente destas espécies cêrca de cento e cincoenta outras se encontram em estudo actualmente. Estamos em contacto permanente e desde há muito tempo com o «Centraal Bureau voor Schimmelcultures» de Baarn, na Holanda, que visitámos repetidas vezes e a quem enviamos de cada espécie estudada, um micélio secundário e os tests isolados, para ali ficarem depositados. Melhor

que a comparação de exemplares de herbário, dificílimos de conservar neste grupo de fungos, a confrontação dos nossos tests com os de outros investigadores permitirá verificar, com tôda a segurança, se as espécies que estudámos são as mesmas ou diferentes. A colecção de BAARN ficará assim enriquecida de espécies vivas padrões, cuidadosamente estudadas ao mesmo tempo do ponto de vista sistemático e genético.

Resta-me agradecer ao Govêrno inglês e, sobretudo, ao Govêrno francês, as bôlsas de estudo que nos concederam e permitiram que durante os últimos sete anos pudéssemos continuar a nossa carreira científica. E aos nossos queridos colegas e amigos, o Prof. ALLORGE, Director do «Laboratoire de Cryptogamie do Muséum d'Histoire Naturelle» de Paris, e o Prof. PRENNANT, Director do «Laboratoire d'Anatomie Comparée» da Sorbonne, o acolhimento e as facilidades de trabalho que nos seus laboratórios nos proporcionaram.

RÉSUMÉ

L'auteur donne une vue d'ensemble sur le résultat de ses recherches dans le domaine de la cytologie et de la génétique des Basidiomycètes depuis qu'il a commencé ses travaux à Berlin, en 1928, sous la direction de KNIEP.

Après une courte exposition de l'état où se trouvaient à cette époque les questions dont il s'est occupé, il fait une mise au point de sa contribution personnelle dans les différents problèmes qu'il a attaqués.

L'étude génétique de la réduction chromatique chez les Hyménomycètes, faite au moyen d'analyses de tétrades, l'avait amené à la conclusion suivante: Dans une même fructification on peut trouver, à côté les unes des autres, des basides avec préréduction, avec postréduction et avec réduction mixte (préréduction pour certaines paires de chromosomes et postréduction pour les autres paires du même noyau diploïde).

Des recherches ultérieures ayant démontré que la postréduction apparente, pour certaines paires de facteurs, peut être la conséquence de phénomènes de crossing-over, il s'agissait maintenant de savoir si tous les cas de postréduction doivent être attribués au

crossing-over, ou si, au contraire, les centromères homologues eux-mêmes, peuvent se séparer dans la deuxième division.

La méthode des cultures bispermes, l'étude cytologique des mycéliums et des carpophores et l'analyse génétique de la descendance des fructifications, ont permis d'élucider la question des copulations illégitimes. Chez les espèces tétrapolaires d'Hyménomycètes une paire de facteurs de stérilité (Aa) provoque une incompatibilité absolue entre haplontes possédant un facteur commun, tandis que pour l'autre paire (Bb) cette incompatibilité est facilement surmontable au moment de la germination des spores et s'accentue progressivement avec l'âge des mycéliums. Les mycéliums illégitimes sont simultanément primaires et secondaires et on peut facilement les amener à la fructification. Les carpophores obtenus possèdent des basides binucléées, avec caryogamie et production de tétrades dicrates; à côté de celles-ci il y a d'autres basides uninucléées, apogames, dont la plupart avortent, par suite d'irrégularités dans la distribution des univalents, et dont quelques-unes donnent lieu à des tétrades monocrates.

Les mycéliums primaires de *Coprinus fimetarius* (identique à *Coprinus lagopus* des auteurs américains) ne fructifient pas. Les très rares exceptions sont le résultat de mutations. Les carpophores obtenus possèdent des basides apogames à tétrades monocrates.

Le nanisme des mycéliums a été étudié du point de vue génétique et physiologique. Il y a des phénomènes de nanisme héréditaire à côté d'autres qui ne sont que des phénocopies. Le nanisme héréditaire, qui ne se manifeste qu'à la phase haploïde, est dû à la présence d'un gène mutant (n) dont l'homozygote dicaryotique n'est pas viable. Les mycéliums secondaires hétérozygotes (Nn) présentent le phénotype normal. Les spores gardent leur germinabilité à peu près intacte dans des milieux de culture dont la tension osmotique varie entre 0,06 et 38 atmosphères. Au dessus de 12 atm., l'augmentation de la tension osmotique du milieu ramène de plus en plus le phénotype des mycéliums génétiquement normaux à celui des nains, sans modifier sensiblement l'aspect de ces derniers.

La diploïdisation de mycéliums primaires par d'autres, secondaires, (Phénomène de Buller) a été étudiée chez une espèce tétrapolaire d'Hyménomycètes (*Coprinus fimetarius*). Dans les confrontations compatibles les nouveaux dicarions du mycélium diploïdisé

se forment par association de noyaux du mycélium primaire avec des noyaux compatibles venus du mycélium secondaire (ab/AB + + A_1 B_1 = ab + A_1 B_1). Dans les confrontations incompatibles (AB/Ab + aB) les nouveaux dicarions du mycélium diploïdisé se forment par association de noyaux du mycélium primaire (AB) avec des noyaux compatibles (ab) venus du mycélium secondaire. Comme ces noyaux n'existaient pas avant la confrontation dans le mycélium secondaire diploïdisant (Ab + aB) l'A. admet qu'ils se sont formés au moment de la confrontation par échange de chromosomes entre noyaux du même dicarion, pendant une division conjuguée.

L'A. considère les Basidiomycètes actuels comme des formes monoïques, depourvues d'organes sexuels par évolution régressive. Les facteurs héréditaires responsables de la bipolarité ou de la tétrapolarité sexuelle des espèces hétérothalles, ainsi que des races géographiques interfertiles, ne sont que des séries allélomorphes de facteurs de stérilité. A la lumière des résultats de ses recherches, l'A. discute l'interprétation théorique de la sexualité des Basidiomycètes dans le cadre générale de la sexualité des autres organismes.

Finalement l'A. donne de résultat de ses recherches sur la conduite sexuelle et la systématique des Hyménomycètes, en collaboration avec les naturalistes du «Muséum National d'Histoire Naturelle» de Paris. La conduite sexuelle de 45 espèces a été déterminée. Plus de 300 autres espèces, dont une grande partie est à l'étude, ont été mises à l'essai. Les confrontations de cultures monospermes, appartenant à des espèces très proches et à des races géographiques de la même espèce, ont permis de constater que des espèces morphologiquement différentes sont toujours interstériles, tandis que des races géographiques morphologiquement identiques sont toujours interfertiles. Se basant sur les résultats de ses recherches, l'A. discute la notion d'espèce chez les Hyménomycètes ainsi que le mécanisme de l'isolement physiologique des populations, isolement qui provoque l'apparition de nouvelles espèces.

BIBLIOGRAFIA

BENSAÚDE, M.

1918 Recherches sur le cycle évolutif et la sexualité des Basidiomycètes. — Thèse. Paris.

BIGGS, R.

1937 The species concept in *Corticium coronilla*, *Mycologia*, **29**, 6, 686-706.

BRUNSWIK, H.

1924 Untersunchungen über die Geschlechts- und Kernverhältnisse bei der Hymenomyzetengattung *Coprinus*. *Botan. Abhandl.*, herausgeg. v. Goebel, **5**.

1926 Die Reduktionsteilung bei den Basidiomyzeten, *Zeitschr. f. Bot.*, **18**, 491-498.

BULLER, A. H. R.

1931 Researches on fungi, Vol. IV, Cap. II, London.

CHOW, C. H.

1934 Contribution à l' étude du développement des Coprins, *Le Botaniste*, **26**, 89-232.

DICKSON, H.

1934 Studies in *Coprinus sphaerosporus*. I. The pairing behaviour and the characteristics of various haploid and diploid strains, *Ann. Bot.*, **48**, 527-547.

1935 II. The inheritance of various morphological and physiological characters, *Ibid.*, **49**, 181-204.

1936 III. The inheritance of factors affecting the growth-rates at different temperatures of certain strains, *Ibid.*, **50**, 219-246.

1936 Observations on inheritance in *Coprinus macrorhizus* (Pers.) Rea, *Ibid.*, **50**, 719-734.

HÜTIG, W.

1931 Ueber den Einfluss der Temperatur auf die Keimung und Geschlechterverteilung bei Brandpilzen, *Zeitschr, f. Bot.*, **24**, 529-577.

1933 Ueber physikalische und chemische Beeinflussungen des Zeitpunktes der Chromosomenreduktion bei Brandpilzen, *Ibid.*, **26**, 1-26.

KNAPP, E.

1936 Zur Genetik von *Sphaerocarpus*, *Ber. d. deuts. bot. Ges.*, **54**, 58-69.

1937 Crossing-over und Chromosomenreduktion, *Zeitschr. f. ind. Abst. u. Vererbl.*, **73**, 409-418.

KNIEP, H.

1928 Die Sexualität der niederen Pflanzen, Jena.

LINDEGREEN, C. C.

1933 The genetics of *Neurospora*. III. Pure bred stocks and crossing-over in *Neurospora crassa*, *Bull. Torrey Bot. Club*, **60**, 133-154.

1936 A six-point map of the sex-chromosome of *Neurospora crassa*, *Journ. Genetics*, **32**, 243-256.

MOUNCE, I. and R. MACRAE

1938 Interfertility phenomena in *Fomes pinicola*, *Canadian Journ. of Research, C*, **16**, 354-376.

OIKAWA, K.

1939 Diploidisation and fruit-body formation in the Hymenomycetes, *Sc. Rep. of the Tôhoku Imp. Univ., 4th. ser., Biology,* **14,** 245-256.

OORT, A. J. P.

1930 Die Sexualität von *Coprinus fimetarius, Rec. Trav. bot. neerlandais,* **27,** 85-148.

PRELL, H.

1921 Das Problem der Unfruchtbarkeit, *Naturwiss. Wochenschr., N. F.,* **20,** 440-446.

QUINTANILHA, A.

1933 I. Sur la possibilité de résoudre des problèmes cytologiques par des méthodes génétiques, *C. R. Ass. des Anatomistes,* **28,** 1-7.

1933 II. Le problème de la sexualité chez les Champignons, *Bol. Soc. Brotereana, 2.ª sér.,* **8,** 1-99.

1933 III. Sur le pouvoir germinatif des spores de *Coprinus,* I., *C. R. Soc. Biol.,* **115,** 456.

1934 I. Sur le pouvoir germinatif des spores de *Coprinus,* II., *Ibid.* **117,** 139.

1934 II. La descendance des copulations illégitimes chez les Hyménomycètes, *Ibid.* **117,** 737.

1935 I. Cytologie des copulations illégitimes chez *Coprinus fimetarius, C. R. Acad. Sc.,* **201,** 23, 1143-45.

1935 II. Cytologie et génétique de la sexualité chez les Hyménomycètes, *Bol. Soc. Brotereana. 2.ª sér.,* **10,** 1-48.

1937 Contribution à l'étude génétique du Phénomène de Buller, *C. R. Acad. Sc.,* **205,** 745.

1938 I. Deuxième contribution à l'étude génétique du Phénomène de Buller, *C. R. Soc. Biol.,* **127,** 1245.

1938 II. Troisième contribution à l'étude génétique du Phénomène de Buller, *Ibid.,* **129,** 730.

1939 Étude génétique du Phénomène de Buller, *Bol. Soc. Brotereana, 2.ª sér.,* **13,** 425-486.

QUINTANILHA, A. et S. BALLE

1938 I. Étude génétique des phénomènes de nanisme chez les Hyménomycètes, *C. R. Soc. Biol.,* **129,** 191.

1938 II. Influence du milieu sur les phénomènes de nanisme chez *Coprinus fimetarius* Fries, *Ibid.,* **129,** 194.

1940 Étude génétique des phénomènes de nanisme chez les Hyménomycètes, *Bol. Soc. Brotereana, 2.ª sér.,* **14,** 17-46.

QUINTANILHA, A., L. QUINTANILHA et A. VASERMANIS

1941 La conduite sexuelle et la systématique des Hyménomycètes, *Rev. de Mycologie,* **6,** 1-48.

RAWITSCHER, F.

1933 *Zeitschr. f. Bot.,* **36,** 136.

VANDENDRIES, R.

1923 I. Recherches sur le déterminisme sexuel des Basidiomycètes, *Mém. cour. de l'Acad. Roy. de Belgique,* **5.**

VANDENDRIES, R.

1923 II. Nouvelles recherches sur la sexualité des Basidiomycètes, *Bull. de la Soc. Roy. Bot. de Belgique,* **56,** I.

1927 I. Les mutations sexuelles, l'hétéro-homothallisme et la stérilité entre races géographiques de *Coprinus micaceus, Acad. Roy. de Belgique, Classe des Sc., Mém.,* **9,** III.

1927 II. Le comportement sexuel du Coprin micacé, dans ses rapports avec la dispersion de l'espèce, *Bull. Soc. Roy. Bot. de Belgique,* **60,** I.

1927 III. Nouvelles recherches expérimentales sur le comportement de *Coprinus micaceus, Mém. de l'Acad. Roy. de Belgique.*

1929 I. Comment résoudre le problème sexuel du Coprin micacé?, *Bull. Soc Roy. Bot. de Belgique,* **61,** II.

1929 II. Les relations entre souches étrangères expliquées par les aptitudes sexuelles des individus parthénogéniques chez *Coprinus micaceus, Bull. Soc. Mycol. France,* **45,** 216.

1930 I. La conduite sexuelle des Hyménomycètes interpretée par les théories de Hartmann concernant la bisexualité et la relativité sexuelle, *Acad. Roy. de Belgique, Bull. Classe des Sc., 5.e sér.,* **16,** 11.

1930 II. Conduite sexuelle de *Psathyrella disseminata* et essais de détermination des valeurs relatives des réalisateurs sexuels selon Hartmann, *Ibid., 5.e sér.,* **16,** 11.

1933 Nouveau critère spécifique des Basidiomycètes, *Bull. Soc. Lin.* Lyon.

VANDENDRIES, R. et G. ROBYN

1929 Nouvelles recherches expérimentales sur le comportement sexuel de *Coprinus micaceus* (Deuxième partie) *Mém. Acad. Roy. de Belgique,* **9.**

ESTAMPA I

Coprinus fimetarius

Fig. 1. Germinação de esporos em gelose ($\times$ 230).
Fig. 2. Carpóforos novos produzidos por um micélio secundário normal.
Fig. 3. Os mesmos dois dias depois.
Fig. 4. Ainda os mesmos um dia mais tarde.
Fig. 5. Eclosão de um dos carpóforos da figura anterior, dezoito horas depois (Ampliação de 3 diâmetros para todos os carpóforos).
Fig. 6. Células do himénio de uma frutificação normal mostrando quatro basídios, cada um com um grande núcleo diplóide e um grande nucléolo à periferia do núcleo. Entre os dois primeiros basídios da direita vê-se uma paráfise cujos núcleos haplóides não se conjugaram. ($\times$ 960).
Fig. 7. Lamela de um carpóforo normal estendida sôbre lâmina de vidro e sêca, para o isolamento de tétradas. ($\times$ 90).

1
2
3
4
5
6
7

ESTAMPA II

Coprinus fimetarius

Figs. 8, 9 e 10. Estados sucessivos do desenvolvimento de um carpóforo ilegítimo ($\times 3$).

Fig. 11. Lamela de uma frutificação ilegítima, estendida sôbre lâmina de vidro para o isolamento das tétradas. Tétradas raras em conseqüência do grande número de basídios abortados ($\times 60$).

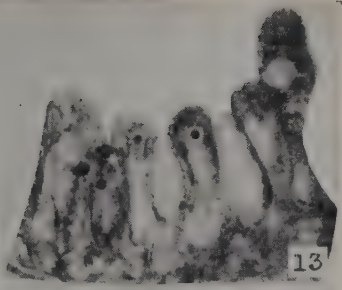
Fig. 12. Himénio jóvem de uma frutificação ilegítima, antes da cariogamia. Vêem-se, lado a lado, basídios uninucleados e binucleados ($\times 820$).

Fig. 13. Células himeniais de um carpóforo ilegítimo com um único núcleo haplóide ($\times 1040$).

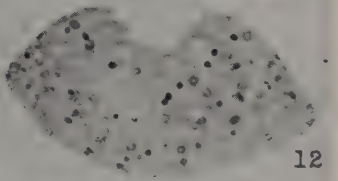
Fig. 14. Himénio de uma frutificação ilegítima, depois da cariogamia e antes da primeira divisão do núcleo dos basídios. Impossível distinguir aqui os núcleos haplóides dos diplóides ($\times 830$).

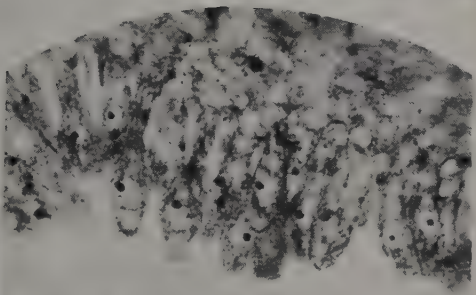
Figs. 15 e 16. Células himeniais de uma frutificação ilegítima. Em cada uma das figuras a segunda célula, a partir da direita, sofreu já a primeira divisão do seu núcleo haplóide e os dois núcleos filhos desceram para a parte média do basídio onde vão degenerar ($\times 1040$).

8


13

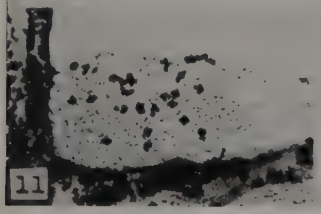
9

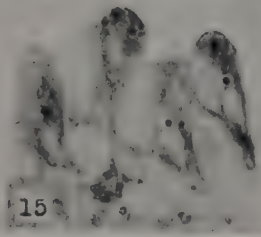

12

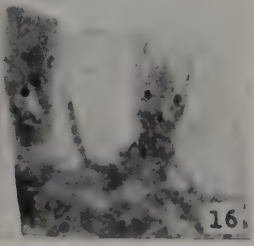


10

14


11


15


16

ESTAMPA III

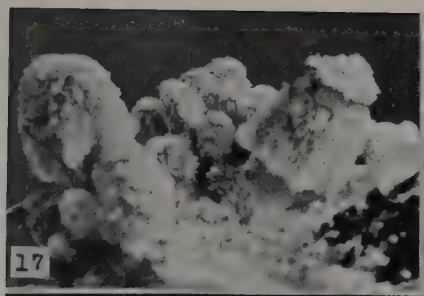
Coprinus fimetarius

Figs. 17 e 18. Desenvolvimento de carpóforos de mutantes haplóides (×3).

Fig. 19. Células da assentada himenial de uma destas frutificações haplóides, cada uma provida de um único núcleo haplóide (×1040).

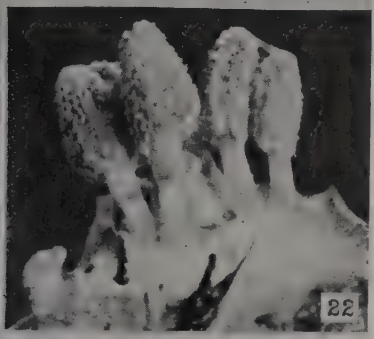
Fig. 20. Himénio de uma destas frutificações haplóides. Ao centro, anafase da primeira divisão do núcleo haplóide do basídio com cromosomas atrazados ao longo do fuso. Nesta figura vêem-se dois centrosomas terminais e oito cromosomas, alguns mal focados na fotografia (×1040).

Figs. 21, 22, 23 e 24. Desenvolvimento de carpóforos produzidos por micélios monospóricos do mutante A" (×3).


17

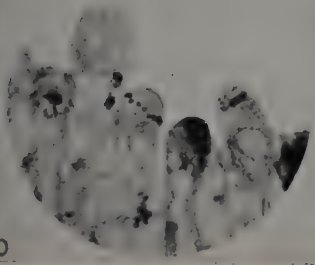
21

18


22

19

23


20

24

MYCETES ALIQUOT LUSIANIAE (*)

V

AUCTORIBUS

EMMANUELE DE SOUSA DA CAMARA

(LABORATORII PATHOLOGIAE VEGETALE)

ET *CARLOS GOMES DA LUZ*

(STATIONIS AGRONOMICAE NATIONALE)

INTRODUCTIO

CONTRIBUTIO haec, praeter species sex novas, mycetes duodeviginti hactenus in Lusitania ignotes continet.

Species asterisco uno notatae florae lusitanicae addendae sunt; quae vero duobus signantur nunc primum describuntur.

Clarissimo Joanni de Vasconcelos qui plantas hospites recognovit et adjutoribus nostri qui eas collegerunt gratias agimus quamplurimas.

PYRENIALES (Fr.) Sacc. et Trav.

VALSACEAE Tul.

Hyalodidymae Sacc.

* 235) **Diaporthe controversa** (Desm.) Fck., in Sacc., *Syll.*, I, 676; Trav., *Pyren., Fl. Ital. Cryptog.*, 272.

In ramulis *Aceris Negundinis* L., pr. Viana do Castelo, leg. Silva Teixeira, aprili, 1941.

236) **Diaporthe Tulasnei** Nke., in Sacc., *Syll.*, I, 657; *Rhytisma Urticae* Tul., *Sel. Fung. Carp.*, II, 64; *Diap. Tulasnei* Nke., in Wint., *Ascomyc.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, II, 602; Trav., *Pyren., Fl. Ital. Cryptog.*, 222.

Unam., *Ascomic. Penins. Iber.*, 84, n. 243.

Colm., *Enum. Revis. Pl. Penins. Hisp.-Lusit.*, V, 680; Sacc., *Consp. Fung. Lusit.*, 38; Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 64.

Niessl, *Fl. Myc. Lusit.*, IV, 17; Wint., *Fl. Myc. Lusit.*, V, 18.

(*) Comunicação apresentada ao Congresso Luso-Espanhol para o Progresso das Ciências — 1942.

In ramulis *Solani nigri* L., pr. Póvoa de Lanhoso (Minho), Leg. Silva Teixeira, junio, 1941.

SPHAERIACEAE (Fr.) Sacc.

Hyalosporae Sacc.

Botryosphaeria Berengeriana De Not., in Sacc., *Syll.*, I, 457; *B. Juglandis* Ces. et De Not., in Sacc., *l. c.*, I, 457; *B. Berengeriana* De Not., in Berl., *Fg. Moric.*, fasc. VI, n. 3, tab. XXIV, fig. 1-8; Wint., *Ascomyc.*, ap. Rabh., *Kryptog-Fl.*, II, 800; Trav., *Pyren., Fl. Ital. Cryptog.*, 412.

Unam., *Ascomic. Penins. Iber.*, 92, n. n. 269, 346 et 1273.

Colm., *Enum. Revis. Pl. Penins. Hisp.-Lusit.*, V, 684; Sacc., *Consp. Fung. Lusit.*, 37; Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 65.

Thüm., *Fl. Myc. Lusit.*, III, 28; Berl., F. Sacc. et Roum., *Fl. Myc. Lusit.*, VIII, 3; Sacc., *Fl. Myc. Lusit.*, X, 10; Alm. et S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, III, IV et V, 14; S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, VI, 7.

In ramulis *Aceris Negundinis* L., in Olisippone (Parque Eugénio de Almeida) et in foliis *Dracaenae Draconis* L., in Horto Polytechnicae Scholae Olisipponis (Facultate Scientiarum), leg. Silva Teixeira, julio, 1940 et januario 1941.

Sociis (in foliis *Dracaenue*) *Anthostomella Yuccae* Thüm., *Phomopsi Fourcroyae* Sacc.; (in ramulis *Aceris*) *Macrophoma Aceris* (Desm.) Sacc. et *Septomyxa Tulasnei* v. Höhn.

Obs.: *Peritheciis saepe geminatis interdumque simplicibus; sporidiis nunquam nucleatis, 13-18 × 7,5-8,5 μ.*

Physalospora Geranii Cke. et Hark., in Sacc., *Syll.*, IX, 593; Ell. et Ev., *Nth. Amer. Pyren.*, 303.

Unam., *Ascomic. Penins. Iber.*, 102, n. 314.

S. Cam., Mycofl. Lusit., X, 18.

In ramulis *Pelargonii* sp., pr. Viana do Castelo (Santa Luzia), leg. Silva Teixeira, aprili, 1941.

Obs.: *Ascis 72-90 × 18-21 μ.*; *sporidiis 15-24 × 6,5-10 μ.*

Phaeosporae Sacc.

* 237) **Anthostomella Yuccae** Thüm., in Sacc., *Syll.*, I; 279.

In foliis *Dracaenae Draconis* L., in Horto Polytechnicae Scholae

Olisipponis (Facultate Scientiarum), leg. Silva Teixeira, januario, 1941.

Sociis *Botryosphaeria Berengeriana* De Not. et *Phomopsi Fourcroyae* Sacc.

Hyalodidymae Sacc.

* 238) **Sphaerella carinthiaca** (Jaap) Sacc. et Trott., *Syll.*, XXII, 128.

In ramulis *Ononidis* sp., pr. Póvoa de Santa Iria, leg. Silva Teixeira, januario, 1941.

Obs.: *Sporidiis leniter chlorinis.*

Phaeophragmiae Sacc.

Leptosphaeria Convallariae Alm. et S. Cam., f. *Rusci* Alm. et S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, III, IV et V, 17; *L. Dracaenae* S. Cam., in Alm., *Mycofl. Port.*, 26; Sacc. et D. Sacc., *Syll.*, XXII, 727.

L. Canvallariae Alm. et S. Cam., f. *Rusci* Alm. et S. Cam., in Unam., *Ascomic. Penins. Iber.*, 173, n. 641.

Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 71.

L. Dracaenae S. Cam., in Alm. et S. Cam., *Rev. Agron.*, I, 23; *L. Convallariae* Alm. et S. Cam., f. *Rusci* Alm. et S. Cam., in S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, VIII et IX, 25.

In foliis *Rusci aculeati* L., pr. Sintra (Monserrate)!, septembri, 1941.

Obs.: *Ascis 66-84* × *11-18* μ.; *sporidiis 22-31* × *4,5-7* μ.

ERYSIPHACEAE Lév.

239) **Erysiphe Cichoracearum** DC., in Wint., *Ascomyc.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, II, 33; *Erys. communis* Fr., p. p., in Tul., *Sel. Fung. Carp.*, I, 214; *Erys. lamprocarpa* (Wallr.) Lév., in Cke., *Brit. Fg.*, II, 650; Sac., *Syll.*, I, 16; *Erys. Cichoracearum* DC., in Ell. et Ev., *Nth. Amer. Pyren.*, 12; Rostr., *Dan. Fg.*, 162.

Erys. lamprocarpa (Wallr.) Lév., in exsicc. Thüm., *Myc. Univ.*, n. 1252; Bri. et Cav., *Fg. Parass.*, n. 263, c. icon.

Erys. Cichoracearum DC., in Unam., *Ascomic. Penins. Iber.*, 10, n. 2.

In *Fl. Lusit. exsicc.*, Cent. XVII, ap. *Bol. Soc. Brot.*, XVIII

(1901) 141, n. 1606; Samp., *Cryptog.*, I, 9; Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 75.

H. et P. Syd., *Pilzfl. Port.*, 4; Frag., *Adic. Micofl. Lusit.*, 8.

In foliis ramulisque *Plantaginis Psyllii* L., pr. Alhandra, leg. Silva Teixeira, majo, 1940.

Erysiphe Polygoni DC., in Sacc., *Syll.*, I, 18; *Erys. communis* (Wallr.) Fr., in Tul., *Sel. Fung. Carp.*, I, 214, c. icon. (tab. V, fig. 3-6); Cke., Brit. Fg., II, 652; Sacc., *l. c.*, I, 18; *Erys. Martii* Lév., in Sacc., *l. c.*, I, 19; Wint., *Ascomyc.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, II, 31; *Erys. communis* (Wallr.) Fr., in Wint., *l. c.*, II, 32; Ell. et Ev., *Nth. Amer. Pyren.*, 10; Rostr., *Dan. Fg.*, 162.

Erys. Martii Lév., in exsicc. Thüm., *Myc. Univ.*, n. n. 156, 449 et 1449; *Erys. communis* (Wallr.) Fr., in Bri. et Cav., *Fg. Farass.*, n. n. 173 et 411 (*Erys. Polygoni* DC.), c. icon.

Erys. communis (Wallr.) Fr. et *Erys. Martii* Lév., in Colm., *Enum. Revis. Pl. Penins. Hisp.-Lusit.*, V, 673; Sacc., *Consp. Fung. Lusit.*, 35; *Erys. Polygoni* DC., in Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 75.

Unam., *Ascomyc. Penins. Iber.*, 16, n. 12.

Erys. Martii Lév., in Thüm., *Fl. Myc. Lusit.*, I, 248; *Erys. communis* Lév., in Thüm., *Fl. Myc. Lusit.*, II, 38 et III, 33; *Erys. Martii* Lév., in Niessl, *Fl. Myc. Lusit.*, IV, 10; *Erys. communis* Wallr., in Alm., *Agric. Contemp.*, X, 173 et XI, 7 (etiamque *Erys. Martii* Lév.); H. et P. Syd., *Pilzfl. Port.*, 4; *Erys. communis* (Wallr.) Fr., in Alm., *Mycofl. Port.*, 24; *Erys. Polygoni* DC., in S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, VIII et IX, 27.

In foliis ramulisque *Torilis nodosae* (L.) Gaertn., pr. Alhandra, leg. Silva Teixeira, majo, 1940.

HYPOCREACEAE De Not.

Hyalophragmiae Sacc.

Gibberella pulicaris (Fr.) Sacc., *Syll.*, II, 552; *Gibbera pulicaris* Fr., in Berk., *Outl. Brit. Fung.*, 403; *Nectria pulicaris* Tul., in Cke., *Brit. Fg.*, II, 780; *Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc., in Wint., *Ascomyc.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, II, 100; Ell. et Ev., *Nth. Amer. Pyren.*, 120; Rostr., Dan. Fg., 174.

Unam., *Ascomic. Penins. Iber.*, 60, n. 156.

Colm., *Enum. Revis. Pl. Penins. Hisp.-Lusit.*, V, 690; Sacc., *Consp. Fung. Lusit.*, 40; Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 78.

Thüm., *Fl. Myc. Lusit.*, II, 31; Niessl, *Fl. Myc. Lusit.*, IV, 19; Berl., F. Sacc. et Roum., *Fl. Myc. Lusit.*, VIII, 6; Rick, *Fung. Tor. Vedr.*, 161; S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, XI, 24; S. Cam. et Luz, *Myc. Lusit.*, IV, 31.

In ramulis emortuis *Robiniae pseudo-Acaciae* L., pr. Sintra (Parque da Pena), leg. Silva Teixeira, februario, 1941.

Sociis *Haplosporella chlorostroma* Speg. et *Fusario lateritio* Nees.

Scolecosporae Sacc.

240) **Cordyceps militaris** (L.) Lk., in Sacc., *Syll.*, II, 572; *Sphaeria militaris* Fr., *Syst. Mycol. Fung.*, II, 323; *C. militaris* Fr., in Berk., *Brit. Fung.*, 382; *Torrubia militaris* (Vaill) Fr., in Tul., *Sel. Fung. Carpol.*, III, 7, c. icon. (Tab., I, fig. 19-31); Cke., *Brit. Fg.*, II, 770, c. icon.; *C. militaris* (L.), in Wint., *Ascomyc*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, II, 150; Ell. et Ev., *Nth. Amer. Pyren.*, 62; Rostr., *Dan. Fg.*, 177; Ramsbott., *Larg. Brit. Fg.*, 192; Clem. et Shear, *Gen. Fg.*, 82, c. icon. (tab. XVI, fig. 11).

Unam., *Ascomic. Penins. Iber.*, 64, n. 165.

Torr. militaris Fr., in auct. ign., *Fl. Cryptog. Nd. Port.*, 264; *Cord. militaris* (L.) Lk., in Colm., *Enum. Revis. Pl. Penins. Hisp.--Lusit.*, V, 689; Sacc., *Consp. Fung. Lusit.*, 41; Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 78.

Niessl., *Fl. Myc. Lusit.*, IV, 20; Wint., *Fl. Myc. Lusit.*, V, 12; Sacc., *Fl. Myc. Lusit.*, X, 12; Torr., *Fung. Setub.*, III, 1 et *Fg. Sel. Exsicc.*, Cent. II, 101, n. 153.

In larvis pupisque *Lepidopterorum*, pr. Mortágua, leg. Dr. Branquinho de Oliveira, decembri, 1940.

LOPHIOSTOMATACEAE Sacc.

Phaeophragmiae Sacc.

Lophiostoma caulium (Fr.) Ces. et De Not., in Cke., *Brit. Fg.*, II, 851; Sacc., *Syll.*, II, 697; Wint., *Ascomyc.*, ap. Rabh., *Kryptog. Fl.*, II, 300.

Unam., *Ascomic. Penins. Iber.*, 235, n. 873.

S. Cam. et Luz, *Myc. Lusit.*, IV, 32.

In ramulis *Artemisiae* (?) sp., pr. Aveiro, leg. Silva Teixeira, aprili, 1941.

HYSTERIALES (Crd.) Sacc. et Trav.

HYSTERIACEAE Crd.

Scolecosporae Sacc.

* 241) **Lophodermium hysterioides** (Pers.) Sacc., *Syll.*, II, 791; Ell. et Ev., *Nth. Amer. Pyren.*, 714.

In foliis *Acaciae* sp., pr. Viana do Castelo (Santa Luzia), leg. Silva Teixeira, aprili, 1941.

SPHAEROPSIDALES (Lév.) Lind.

SPHAERIOIDACEAE Sacc.

Hyalosporae Sacc.

242) **Asteroma reticulatum** (DC.) Chev., in Sacc., *Syll.*, III, 214; *Aster. reticulatum* Berk., in Cke., *Brit. Fg.*, I, 460; *Aster. reticulatum* (DC.) Chev., in Allesch., *Sphaerioid.*, ap. Rabh., *Kryptog-Fl.*, VI, 458; *Ascospora reticulata* (Fr.), in Rostr., *Dan. Fg.*, 200.

Aster. reticulatum (DC.) Chev., in Unam., *Esferopsid. Penins. Iber.*, 145, n. 664.

In Lusitania (?), sec. Sacc. *l. c.* III, 214.

In foliis ramulisque *Polygonati officinalis* All., in Bussaco, leg. Silva Teixeira, septembri, 1941.

Cytospora Beaufortiae S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, VI, 15; Sacc. et Trott., *Syll.*, XXII, 957.

In foliis *Myrti communis* L., pr. Braga (Minho), leg. Silva Teixeira, junio, 1941.

Obs.: *Sporulis angustioribus, usque 1,5 μ. crassis.*

Cytospora chrysosperma (Pers.) Fr., in Sacc., *Syll.*, III, 260; *Cytispora chrysosperma* Fr., in Cke., *Brit. Fg.*, II, 462; *Cytosp. chrysosperma* (Pers.) Fr., in Allesch., *Sphaerioid.*, ap. Rabh.,

Kryptog.-Fl., VI, 591; Trav., *Pyren.*, *Fl. Ital. Cryptog.*, 94; *Valsa sordida* Nitsch., in Rostr., *Dan. Fg.*, 237 et 432; *Cytosp. chrysosperma* Fr., in Grv., *Sphaeropsid.*, I, 272.

Unam., *Esferopsid. Penins. Iber.*, 172, n. 775 et 385, n. 1690.

S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, X, 30.

In ramulis *Populi albae* L., pr. Viana do Castelo (Santa Luzia), leg. Silva Teixeira, aprili, 1941.

Obs.: Forma pycnidica *Valsae sordidae* Nitsch.

** 243) *Fusicoccum Acaciae* n. sp. (Tab. I, fig. 1-4).

Stromatibus solitariis, innato-erumpentibus, verrucosis, conoideis, disco albido, epidermide irregulariter fissa, zona brunneola subcutaneaque cinctis, plurilocularibus, intus olivaceis, minutis, 0,5-1 mm.; loculis valsiformibus, obconoideis in transversali sectura; sporophoris filiformibus, plerumque simplicibus vel interdum bifurcatis, achrois, longiusculis, usque 35 μ.; sporulis tereti-bacillaribus, rectis, biguttatis, hyalinis 9-12 × 2,5 μ.

In foliis *Acaciae* sp., pr. Viana do Castelo (Santa Luzia), leg. Silva Teixeira, aprili, 1941.

* 244) **Macrophoma Aceris** (Desm.) Sacc., *Syll.*, XI, 496; Allesch., *Sphaerioid.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, VI, 354.

In ramulis *Aceris Negundinis* L., in Olisippone (Parque Eugénio de Almeida), leg. Silva Teixeira, julio, 1940.

Sociis *Botryosphaeria Berengeriana* De Not. et *Septomyxa Tulasnei* v. Höhn.

Macrophoma Henriquesiana Alm. et S. Cam., *Rev. Agron.*, II, 218 et *Mycofl. Lusit.*, III, IV et V, 40; Sacc. et D. Sacc., *Syll.*, XVIII, 272; *Dothiorella Henriquesiana* (Alm. et S. Cam.) Pet., in Pet. et Syd., *Pyren., Sphaeropsid., Melancon.*, 223.

Doth. Henriquesiana (Alm. et S. Cam.) Pet., in Unam., *Esferopsid. Penins. Iber.*, 159, n. 722.

Macroph. Henriquesiana Alm. et S. Cam., in Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 96.

Alm. et S. Cam., *l. c.*; G. Mariani, *Fung. Port.*, 10; S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, XI, 27.

In ramulis *Dahliae* sp., pr. Palmela (Setúbal), leg. Silva Teixeira, novembri, 1940.

Socia *Phoma Dahliae* Berk.

Obs.: *Pycnidiis nunquam in stromate basilari botryose aggregatis nec in stromate pulvinato immersis; sporophoris usque 13 μ.; sporulis 13-18 × 5-8 μ.*

A *Macrophomina Phaseoli* (Maubl.) Ashby [*Rev. Appl. Mycol.*, VI, (1927) 757] affinis est [*Thelma Benett* Post, in *Biologic. Abstr.*, VIII, 860, n. 7844 et *Rev. Appl. Mycol.*, XII (1933), 763-764].

** 245) **Macrophyllosticta (Phyllosticta) Hydrangeaecola** n. sp. (Tab. I, fig. 5-6).

Pycnidiis in maculas irregulares, brunneas, fusco-cinctas insidentibus, sparsis, primo immersis, dein prominentibus, orbicularibus, excipulo crassiusculo, poro pertusis, 120-200 μ. diam.; sporophoris fasciculatis, plus minusve cylindraceis, simplicibus, achrois, minutis, 10-12 μ. longis; sporulis copiosis, fusoideis, interdum quoque oblongis, continuis, rectis, utrinque rotundatis vel uno vertice attenuatis, nubilosis, hyalinis, 13-23 × 4,5-5,5 μ.

In foliis *Hydrangeae hortensis* Sm., pr. Sintra (Monserrate),!, septembri, 1941.

Socia *Ellisiella Hydrangeae* n. sp.

Phoma Bauhiniae F. Tassi, in Sacc. et P. Syd., *Syll.*, XVI, 866; Allesch., *Sphaerioid.*, ap. Rabh., *Kryptog-Fl.*, VII, 789.

Unam., *Esferopsid Penins. Iber.*, 61, n. 269.

S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, VI, 12.

In ramulis *Bauhiniae* sp., in Olisippone (Parque Eduardo VII), leg. Silva Teixeira, julio, 1940.

Socio *Myxosporio obtusipede* (Sacc.) Allesch.

Obs.: *Sporulis 5-9 × 2-2,5 μ.*

* 246) **Phoma Dahliae** Berk., in Sacc., *Syll.*, III, 169; Grv., Sphaeropsid., I, 79.

In ramulis *Dahliae* sp., pr. Palmela (Setúbal), leg. Silva Teixeira, novembri, 1940.

Socia *Macrophoma Henriquesiana* Alm. et S. Cam.

Obs.: *Pycnidiis sparsis, primo tectis, dein papillula erumpentibus, numerosis, subglobosis piriformibusve, excipulo crassiusculo, nigris, 150-200 μ. diam.; sporophoris non visis; sporulis copiosissimis, coalescentibus, plerumque subcylindraceis interdumque elli-*

psoideis, rectis, continuis, utrinque rotundatis, biguttatis, hyalinis, 3-5 × 1,8 μ.

* 247) **Phoma Elaeagni** Sacc., var. **ramulicola** Brun., in Sacc., *Syll.*, XI, 486; Allesch., *Sphaerioid.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, VI, 206.

In ramulis *Elaeagni angustifoliae* L., in Horto Botanico Polytechnicae Scholae Olisipponis (Facultate Scientiarum), leg. Silva Teixeira, aprili, 1941.

* 248) **Phomopsis Fourcroyae** Sacc. (?), in Sacc. et Trott., *Syll.*, XXII, 904.

In foliis emortuis *Agaves americanae* L. et *Dracaenae Draconis* L., in Horto Polytechnicae Scholae Olisipponis (Facultate Scientiarum) et pr. Sacavem, leg. Silva Teixeira, decembri, 1940 et januario, 1941.

In *Agaves* socio *Colletotricho Agaves* Cav. et in *Dracaenae* sociis *Botryosphaeria Berengeriana* De Not. et *Anthostomella Yuccae* Thüm.

Obs.: *Pycnidiis aliquantum majoribus, interdumque clypeatis; sporophoris 15 × 2 μ.; sporulis binucleatis etiamque saepe cum guttula centrali, tunc triguttatis et quoque pseudoseptatis.*

* 249) **Placosphaeria Stellatarum** Sacc., *Syll.*, III, 245; Allesch., *Sphaerioid.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, VI, 540 et 544; Grv., *Sphaeropsid*, I, 242.

Unam., *Esferopsid. Penins. Iber.*, 168, n. 757.

In foliis *Sherardiae arvensis* L., pr. Nine, (Minho), leg. Silva Teixeira, aprili, 1941.

Obs.: *Sporulis usque 50 μ. longis.*

Phaeosporae Sacc.

* 250) **Coniothyrium Castagnei** Sacc., *Syll.*, III, 309; Allesch., *Sphaerioid.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, VII, 40; Rostr., *Dan. Fg.*, 216.

Unam., *Esferopsid. Penins. Iber.*, 306, n. 1379.

In ramulis *Jasmini* sp., in Olisippone (Parque Eugénio de Almeida), leg. Silva Teixeira, januario, 1941.

Sociis *Diplodia Jasmini* Westd. et *Melanconio Jasmini* n. sp.

Obs.: *Pycnidiis sparsis gregariisve, papilla erumpentibus; sporulis ellipsoideis, aliquantum majoribus, 8-13 × 4-4,5 μ.*

* 251) **Haplosporella chlorostroma** Speg., in Sacc., *Syll.*, III, 323.

In ramulis emortuis *Ceratoniae Siliquae* L. et *Robiniae pseudo-Acaciae* L., in Olisippone (Parque Eugénio de Almeida) et Sintra (Parque da Pena), leg. Silva Teixeira, januario februarioque, 1941.

Sociis *Gibberella pulicare* (Fr.) Sacc. et *Fusario lateritio* Nees. (in *Robinia pseudo-Acacia* L.).

Phaeodidymae Sacc.

* 252) **Diplodia Jasmini** Westd., in Sacc., *Syll.*, III, 346; Allesch., *Sphaerioid.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, VII, 129; Grv., Sphaeropsid., II, 44.

In ramulis *Jasmini* sp., in Olisippone (Parque Eugénio de Almeida), leg. Silva Teixeira, januario, 1941.

Sociis *Coniothyrio Castagnei* Sacc. et *Melanconio Jasmini* n. sp.

* 253) **Diplodia Lonicerae** Fck., in Cke., *Brit. Fg.*, II, 881; Sacc., *Syll.*, III, 345; Allesch., *Sphaerioid.*, ap. Rabh., *Kryptog-Fl.*, VII, 134; Grv., *Sphaeropsid*, II, 46.

In ramulis *Lonicerae Periclymeni* L., pr. Sintra (Parque da Pena), leg. Silva Teixeira, januario, 1940.

Obs.: *Sporulis 20-30 × 11-13 μ.*

Scolecosporae Sacc.

* 254) **Rhabdospora Telephii** Strasser (?), in Sacc. et Trott., *Syll.*, XXII, 1124.

In ramulis *Tiliae argenteae* Desf., pr. Viana do Castelo (Santa Luzia), leg. Silva Teixeira, aprili, 1940.

Obs.: *Pycnidiis globoso-depressis, usque 340 μ. diam.; sporulis 18-28 × 1 μ.*

Septoria Convolvuli Desm., in Cke., *Brit. Fg.*, I, 444; Sacc., *Syll.*, III, 536; *S. flagellaris* Ell. et Ev., in Sacc., *l. c.*, X, 377; *S. Convolvuli* Desm., in Allesch., *Sphaerioid.*, ap. Rabh., *Kryptog-*

-Fl., VI, 764; *S. flagellaris* Ell et Ev., in Allesch.; *l. c.*, VI, 765; *S. Convolvuli* Desm., in Rostr., *Dan. Fg.*, 458; Grv., *Sphaeropsid.*, I, 377.

Unam., *Esferopsid. Penins. Iber.*, 223, n. 1002.

Colm., *Enum. Revis. Pl. Penins. Hisp.-Lusit.*, V, 720; Sacc., *Consp. Fung. Lusit.*, 50; Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 112.

Thüm., *Fl. Myc. Lusit.*, I, 251 et II, 54; Wint., *Fl. Myc. Lusit.*, VI, 18; Alm., *Mycofl. Port.*, 37; S. Cam., *Mycofl. Lusit.*, X, 50.

In foliis *Convolvuli arvensis* L., in Horto Instituti Agronomici Olisipponis (Tapada da Ajuda), leg. Garcia Cabral, decembri, 1940.

MELANCONIALES (Crd.) Sacc. et Trav.

MELANCONIACEAE (Crd.) Sacc. et Trav.

Hyalosporae Sacc.

Colletotrichum Agaves Cav., in Sacc., Syll., XI, 570; Allesch., *Melancon.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, VII, 555.

Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 116.

Sacc., *Fl. Myc. Lusit.*, XII, 14; S. Cam. et Luz, *Myc. Lusit.*, III, 189.

In foliis *Agaves americanae* L., pr. Sacavém, leg. Silva Teixeira, decembri, 1940.

Socia *Phomopsi Fourcroyae* Sacc.

Obs.: *Setis numerosis; conidiophoris 13-21* × *4* μ.; *conidiis 18-29* × *4-5,5* μ.

** 255) **Mixosporium obtusipes** (Sacc.) Allesch., *Melancon.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, VII, 512, c. icon. (513); *Gloeosporium obtusipes* Sacc., *Syll.*, X, 451.

In ramulis *Bauhiniae* sp., in Olisippone (Parque Eduardo VII), leg. Silva Teixeira, julio, 1940.

Socia *Phoma Bauhiniae* F. Tassi.

Obs.: *Sporulis 10-16,5* × *5* μ.

Phaeosporae Sacc.

** 256) **Melanconium Jasmini** n. sp. (Tab. I, fig. 7-8).

Acervulis sparsis gregariisve, primo epidermide tectis, dein

fissa erumpentibus, hemisphaerioideis, nigris 100-180 μ. diam.; conidiophoris non visis; conidiis ellipsoideis, subglobosis, rare ovoideis, episporio crassiusculo, utrinque rotundatis, rectis, pellucidis, dilute brunneis, 4,5-8 × 3-4,5 μ.

In ramulis *Jasmini* sp., in Olisippone (Parque Eugénio de Almeida), leg. Silva Teixeira, januario, 1941.

Sociis *Coniothyrio Castagnei* Sacc. et *Diplodia Jasmini* Westd.

Hyalodidymae Sacc.

* 257) **Septomyxa Tulasnei** v. Höhn., *Ann. Mycol.*, I (1903), 527;? *Myxosporium Tulasnei* Sacc., Syll., III, 723; Allesch., *Melancon.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, VII, 511; *M. Spaethianum* Allesch., *l. c.*, VII, 511; Sacc. et P. Syd., *Syll.*, XIV, 1014; *S. Aesculi* Sacc., *Syll.*, III, 766, f. *Aceris* Roum.;? *S. Negundinis* All., in Sacc. et P. Syd., *Syll.*, XIV, 1020; Allesch., *l. c.*, VII, 611; *Stagonospora collapsa* Sacc., *Syll.*, III, 448; Allesch., *l. c.*, VI, 966.

In ramulis *Aceris Negundinis* L., in Olisippone (Parque Eugénio de Almeida), leg. Silva Teixeira, julio, 1940.

Sociis *Botryosphaeria Berengeriana* De Not. et *Macrophoma Aceris* (Desm.) Sacc.

Obs.: *Conidiis plerumque continuis, interdum uniseptatis (an quoque biseptatis?) usque 21 × 5 μ.*

Phaeodidymae Sacc.

** 258) **Didymosporium Spartii** n. sp. (Tab. II, fig. 1-3).

Acervulis innato-erumpentibus, epidermide fissa cinctis, sparsis gragariisve, punctiformibus, irregularibus, initio melleis, dein atris, minutis, 165-350 μ. diam.; conidiophoris filiformibus, simplicibus, continuis, hyalinis, 7-13 μ. longis; conidiis ovoideis ellipsoideisve, utrinque rotundatis vel basi attenuatis, eguttatis, rectis etiamque leniter curvulis, medio uniseptatis, non constrictis, brunneo-fuligineis, 15-29 × 7,5-11 μ.

In ramulis *Spartii juncei* L., pr. Sacavém, leg. Silva Teixeira, augusto, 1940.

HYPHALES (Mart.) Sacc. et Trav.

TUBERCULARIACEAE Ehrb.

Hyalophragmiae Sacc.

Fusarium lateritium Nees., in Sacc., Syll., IV, 694; *F. pyrochroum* (Desm.) Sacc., *l. c.*, 694; *F. lateritium* Nees., in Berk., *Outl. Brit. Fung.*, 341; Lind., *Hyph.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, IX, 526; *F. pyrochroum* (Desm.) Sacc., in Lind., *l. c.*, IX, 525; Ferrar., *Hyph., Fl. Ital. Cryptog.*, 76; *F. lateritium* Nees., in Ferrar., *l. c.*, 79; Wollenw. et Reink., *Die Fusar.*, 88.

S. Cam. et Luz, *Myc. Lusit.*, IV, 45.

In ramulis *Robiniae pseudo-Acaciae* L., pr. Sintra (Parque da Pena), leg. Silva Teixeira, februario, 1941.

Sociis *Gibberella pulicare* (Fr.) Sacc. et *Haplosporella chlorostroma* Speg.

STILBACEAE Fr.

Hyalophragmiae Sacc.

** 259) **Atractium lusitanicum** n. sp. (Tab. II, fig. 4-5).

Synnematibus congestis, molliusculis, simplicibus, rare bifurcatis, cylindraceis, minutis, usque 400×120 μ., capitulo gelatinoso subellipsoideoque, hyphis erectis, pluricellularibus albescentibusque; conidiophoris cylindraceis, divaricatis, simplicibus (an interdum ramosis?), levibus, pellucidis, achrois; conidiis fusoideis, rectis vel falcatis, utrinque attenuatis basique distincte angustioribus, bi, tri et plerumque tetralocularibus, cum septis saepe salientibus ideoque non constrictis, hyalinis, sed in acervo chlorinis, 26-57×6,5-9 μ.

In corruptis culturis Stationis Agronomicae Nationalis Olisipponis,!, junio, 1941.

DEMATIACEAE Fr.

Hyalosporae Sacc.

** 260) **Ellisiella Hydrangeae** n. sp. (Tab. II, fig. 6-8).

Caespitulis epiphyllis, punctiformibus, in maculas irregulares, cremeas, fusco-cinctas, magnas dispositis, solitariis, rare confluentibus, superficialibus, aterrimis; setulis numerosis, simplicibus,

erectis, rigidis, apice attenuatis, parce septatis (1-3), ambitus sinuosi, basi bulbillosis, fuligineis, longiusculis, usque 70 μ.; conidiophoris copiosis, plus minusve cylindraceis, rectis, achrois, sporula aequantibus vel plerumque minoribus; conidiis oblongis, directis, utrinque rotundatis vel interdum deorsum attenuatis, nubilosis, hyalinis, 10-16 × 4-5 μ.

In foliis Hydrangeae hortensis Sm., pr. Sintra (Monserrate)!, septembri, 1941.

Socia *Macrophyllosticta* (*Phyllosticta*) *Hydrangeaecola* n. sp.

Phaeosporae Sacc.

Periconia pycnospora Fresen., in Sacc., *Syll.*, IV, 271; Lind., *Hyph.*, ad Rabh., *Kryptog.-Fl.*, VIII, 613; Ferrar., *Hyph., Fl. Ital. Cryptog.*, 238.

Trav. et Spes., *Fl. Mic. Port.*, 123.

Alm. et S. Cam., *Rev. Agron.*, I, 333, et *Mycofl. Lusit.*, III, IV et V, 62; Frag., *Fl. Mic. Lusit.*, 48; S. Cam. et Luz, *Myc. Lusit.*, IV, 46.

In ramulis *Solani nigri* L., pr. Póvoa de Lanhoso (Minho), leg. Silva Teixeira, junio, 1941.

Phaeodidymae Sacc.

261) **Bispora monilioides** Crd., in Sacc., *Syll.*, IV, 343; Lind., *Hyph.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, VIII, 767; Ferrar., *Hyph., Fl. Ital. Cryptog.*, 308.

Frag., *Fl. Mic. Lusit.*, 43.

In ramulis *Jasmini* sp., pr. Luso, leg. Silva Teixeira, augusto, 1941.

Obs.: *Conidiis saepe constrictis, 17-22 × 6,5-10 μ.*

Phaeodictyae Sacc.

* 262) **Coniothecium applanatum** Sacc., *Syll.*, IV, 508; Lind., *Hyph.*, ap. Rabh. *Kryptog.-Fl.*, IX, 166, c. icon. (167); Ferrar., *Hyph., Fl. Ital. Cryptog.*, 462; Rostr., *Dan. Fg.* 533.

In ramulis *Salicis atro-cinereae* Brot., pr. Barcelos (Minho), leg. Silva Teixeira, aprili, 1941.

* 263) **Macrosporium nitens** (Fres.) Sacc., *Syll.*, IV, 533; Lind., *Hyph.*, ap. Rabh., *Kryptog.-Fl.*, IX, 249; Ferrar., *Hyph., Fl. Ital. Cryptog.*, 506.

In fructibus *Lagenariae vulgaris* Ser., pr. Vendas Novas (Alentejo), leg. Duarte Ferreira, martio, 1941.

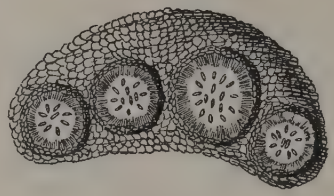


Fig. II

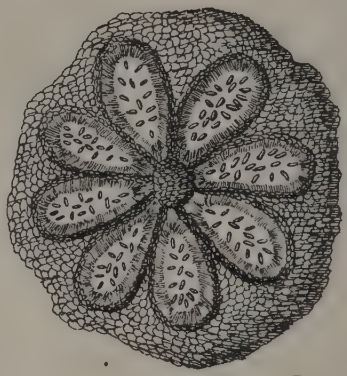


Fig. I

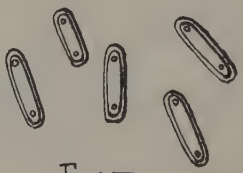


Fig. III

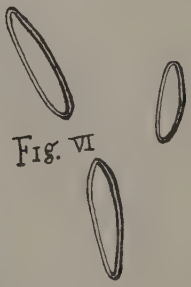


Fig. VI

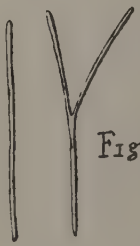


Fig. IV

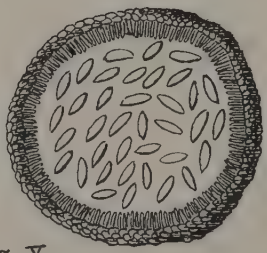


Fig. V

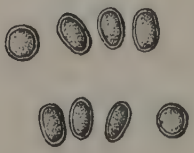


Fig. VIII

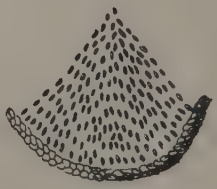


Fig. VII

Fig. I

Fig. II

Fig. III

Fig. IV

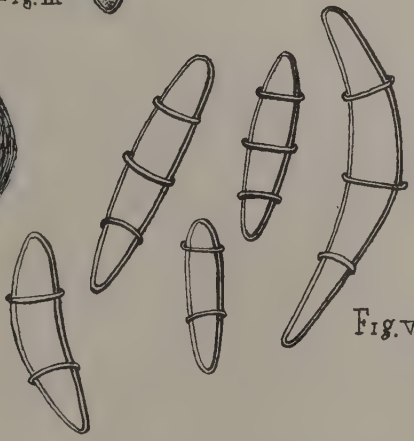


Fig. V

Fig. VII

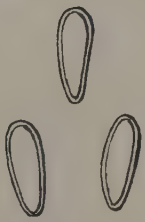


Fig. VIII

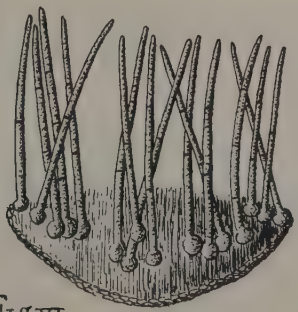


Fig. VI

ÀCÊRCA DO VALOR TAXONÓMICO DO NÚMERO DE DENTES DA FÔLHA NA SEPARAÇÃO DE DOIS HÍBRIDOS DO GÉNERO *VITIS* L.

POR *ACÚRCIO RODRIGUES*
(ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL)

INTRODUÇÃO

DEMONSTRÁMOS em trabalho anterior, RODRIGUES (1941), que para uma mesma variedade ou híbrido o número de dentes está correlacionado com a superfície da fôlha no fim do seu completo desenvolvimento. Por conseqüência, intervindo as condições fisiológicas da planta no maior ou menor desenvolvimento foliar, ficou implìcitamente demonstrado que essas condições podem ser responsáveis por diferenças de recorte que se observem.

Sugerimos nesse estudo que tal influência se manifesta num estado muito atrasado: durante a diferenciação na prefolheatura. CROSS (1938) escreve, pág. 257:

> «Comparative studies of young cataphylls and foliage leaves show conclusively that histogenetic divergences occur at a very early stage» e «that these divergent stages are conditioned by even earlier phases which are characterized by physiological differences.»

Verificámos depois que as condições fisiológicas continuam a intervir na morfologia da fôlha, no decurso do desenvolvimento foliar. Àcêrca da influência do meio nas modificações de certas características, pronunciaram-se vários ampelógrafos no 5.º Congresso Internacional da Uva e do Vinho, realizado em Lisboa em Outubro de 1938, como MOOG, TEODORESCU e DALMASSO. Êste último referiu-se aos trabalhos de HACKBARTH & SCHERZ (1935) sôbre a influência do fotoperiodismo na forma e recorte da fôlha, etc.

Todavia, quando da prefolheatura, essa influência manifesta-se de igual modo sôbre tôda a superfície da fôlha. Por êsse facto, as fôlhas no princípio do desabrolhamento são normalmente simétricas.

MOLON (1906) afirma que as características do desabrolhamento são de grande estabilidade.

Ao contrário, durante o crescimento essa influência reveste um carácter local: as fôlhas tornam-se geralmente assimétricas, sofrem reduções no desenvolvimento de determinadas nervuras, etc.

Assim, numa fôlha nìtidamente encurtada pelo fraco desenvolvimento da nervura principal mediana, observámos que êsse fraco desenvolvimento poderia ter sido motivado por um forte traumatismo no meritalo, sôbre os feixes foliares que davam origem aos feixes dorsais do pecíolo.

> No trabalho citado diz MOLON (1906), pág. 292: «Le foglie di vite sono quasi sempre polimorfe, spesso asimmetriche; hanno perfino rispetto all'asse, sul quale si uniscono, un portamento variabilissimo.» e «Si sa poi che sulla posizione della lamina fogliare influisce la direzione del tralcio; e così aggiungeremo di osservare solo le foglie situate su tralci verticali e possibilmente non intrecciati, o aduggiati da altri.»
>
> e RAVAZ (1902) escreve, pág. 15: «Toutes les feuilles sont *asymétriques*, et irrégulièrement asymétriques suivant, m'a-t-il semblé, que le prompt bourgeon placé à leur aisselle s'est développé ou non. Il s'ensuit que les deux côtés de la feuille n'ont ni la même forme, ni la même largeur, et que le rapport de leurs largeurs est inconstant. La partie qui est toujours semblable à elle-même est celle qui correspond à l'*oeil* normal et latent placé à l'aisselle du pétiole; c'est aussi la plus développée,...»

Nós observámos, Estampas II e III, que o lado menos desenvolvido da fôlha corresponde normalmente ao lado em que na axila se desenvolve um dos gomos existentes, e não sabemos ainda se essa redução é ocasionada pelo desabrolhamento do gomo ou se os dois fenómenos são concomitantemente provocados por outra ou outras causas, porquanto existem fôlhas assimétricas em que o gomo ou gomos axilares se mantêem dormentes. Isto está sendo objecto do nosso estudo e desde já podemos afirmar que são as condições externas que determinam de entre os gomos duma mesma axila aquele que vem a desabrolhar.

Assim, verificámos que é no lado exposto a uma maior iluminação que o desabrolhamento se realiza, e que essa influência se manifesta ao longo de tôda a vara, independentemente da posição

desta, iniciando a sua acção num estado muito atrasado do desenvolvimento foliar. É também dêsse lado que as fôlhas apresentam as metades de menor superfície.

Mas, apesar dessa integral de condições, as mais diversas, que fazem variar a forma e as dimensões das fôlhas; das analogias existentes no sistema nerval de diferentes formas cultivadas, como demonstrámos em estudo anterior, RODRIGUES (1940), constitui a fôlha adulta um dos elementos de maior valor ampelotaxonómico. O que, de resto, foi opinião expendida por vários autores no Congresso de 1938, entre os quais apontaremos: NAVARRO & VASCONCELOS, TEODORESCU e DALMASSO. Êste ampelógrafo afirmou poderem as fôlhas ser algumas vezes suficientes para a identificação duma videira.

De entre os trabalhos ampelométricos em que a fôlha foi utilizada, citaremos os de GOETHE (1876), referido por PEROLD (1927), RAVAZ (1902), BRUNI (1929) e BILLEAU (1937).

E isso porque existem diferenças mais ou menos marcadas nas fôlhas das diversas formas submetidas ao cultivo. Porém, na apreciação dessas diferenças é absolutamente necessário entrar em linha de conta com as leis do crescimento, atendendo especialmente às modificações de forma, com as condições em que a planta se desenvolve, com as flutuações próprias dos diversos caracteres, com as anomalias que se possam verificar, etc.

É necessário ainda notar que os caracteres que servem para a separação de duas formas podem não ser significantemente diferentes entre quaisquer outras e por conseqüência para estas teremos que procurar novas relações. DALMASSO (1938) fez notar as dificuldades para eliminar as dúvidas e incertezas, sobretudo em matéria de sinonimia, e MOOG (1938) as dificuldades para determinar a autenticidade em caso de dúvida.

Na 6.ª conclusão do nosso já citado trabalho, RODRIGUES (1940), referimo-nos às modificações na inervação que podem aparecer junto da periferia da fôlha e que alteram o número de dentes em diversas formas cultivadas do género *Vitis*. No presente trabalho, realizado com o fim de identificar os diversos porta-enxêrtos que constituem o material utilizado num estudo de afinidade, procurámos averiguar o valor taxonómico dessas modificações, apresentando seguidamente os primeiros resultados do estudo empreendido.

MATERIAL E MÉTODOS

O material submetido a estudo foi recebido sob as designações de *Riparia grande glabra, Rupestris du Lot, Riparia* × *Rupestris 101-14* e *Riparia* × *Rupestris 3306.* Porém, como a sua origem é de certo modo duvidosa, porque juntamente com estas foram recebidas outras videiras cujos nomes não podem corresponder ao que realmente são, impunha-se um estudo taxonómico.

Mas, como o assunto que agora nos interessa é simplesmente o valor ampelotaxonómico do número de dentes da fôlha, continuamos a designar estas plantas pelos nomes por que foram recebidas.

As populações apresentavam grande homogeneidade nos seus caracteres; o terreno, dada a sua utilização, era bastante uniforme, e as plantas foram distribuídas com fins de análise estatística de ulteriores resultados.

Tendo em vista reforçar com novos elementos as conclusões a que chegámos no estudo atrás referido, RODRIGUES (1941), apresentamos em primeiro lugar, neste trabalho, os números obtidos para os coeficientes de correlação entre as dimensões das fôlhas, definidas pelo comprimento da nervura principal mediana, e o número de dentes em cada região para a *V. riparia grande glabra, V. rupestris du Lot* e *Riparia* × *Rupestris 3306,* além dos já apontados para a *Riparia* × *Rupestris 101-14* (Tabela I).

Para determinarmos o valor taxonómico do número de dentes da fôlha, escolhemos os dois híbridos: *Riparia* × *Rupestris 3306* e *Riparia* × *Rupestris 101-14.*

Fizemos nova colheita de material completamente desenvolvido e considerámos para cada metade da fôlha as mesmas três regiões, tomadas independentemente: a primeira, entre a nervura principal mediana e a primeira principal lateral; a segunda, entre esta nervura e a segunda principal lateral; e a terceira, compreendendo tôda a superfície da fôlha abaixo desta última nervura.

Do material colhido separámos três classes conforme o comprimento da nervura principal mediana: entre 45 e 55 mm., 65 e 75 e 90 a 150 mm.

O número de casos variou entre 100 e 200, em quinze amostras, e entre 50 e 100, nas três restantes.

Fizemos depois a prova de significância da diferença das médias para os dois híbridos, em cada uma das classes nas três regiões consideradas (Tabela II).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise da Tabela I verificamos que os valores de *t* encontrados são todos altamente significantes para o nível 1 %.

Tal como tínhamos afirmado quando ensaiámos os valores de *t* para o híbrido *Riparia* × *Rupestris 101-14*, podemos dizer que é muito pouco provável que nas condições de amostragem casual os dados experimentais obtidos para a *Riparia grande glabra*, *Rupestris du Lot* e *Riparia* × *Rupestris 3306*, provenham de populações não correlacionadas.

TABELA I

Regiões	Videiras submetidas a estudo	Número de casos	r
I	*V. riparia grande glabra*	126	0,636 ± 0,053
	V. rupestris du Lot.	376	0,533 ± 0,037
	Riparia × *Rupestris 101-14*. . . .	400	0,636 ± 0,030
	Riparia × *Rupestris 3306*.	252	0,572 ± 0,042
II	*V. riparia grande glabra*	96	0,594 ± 0,066
	V. rupestris du Lot.	383	0,527 ± 0,037
	Riparia × *Rupestris 101-14* . . .	400	0,623 ± 0,031
	Riparia × *Rupestris 3306*.	221	0,527 ± 0,049
III	*V. riparia grande glabra*	96	0,527 ± 0,074
	V. rupestris du Lot.	324	0,535 ± 0,040
	Riparia × *Rupestris 101-14*. . . .	400	0,651 ± 0,029
	Riparia × *Rupestris 3306*.	208	0,472 ± 0,054

Portanto, se o número de dentes está correlacionado com o comprimento da nervura principal mediana da fôlha adulta, para podermos avaliar a importância taxonómica dêsse carácter necessitamos comparar fôlhas em que essa nervura tenha determinados comprimentos.

Assim fizemos, e da análise da Tabela II podemos concluir que para qualquer das regiões o valor da significância aumenta conforme comparamos classes de maiores comprimentos da nervura principal mediana, isto é, a probabilidade de que as amostras consideradas provenham da mesma população é muito mais baixa na classe 90-150 mm.

De facto, para a classe 45-55 mm. o grau de significância da diferença das médias, para qualquer das regiões, é menor (para a Região I nem existe significância) do que para a classe 65-75, e torna-se altíssimo para as três regiões na classe 90-150 mm.

TABELA II

Regiões	Comprim. da nerv. princ. med. mm.	*Rip.* × *Rup. 101-14*		*Rip.* × *Rup. 3306*		Diferenças das médias	$\frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{S_{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}}$
		$\overline{X}_1$	$S^2_{\overline{X}_1}$	$\overline{X}_2$	$S^2_{\overline{X}_2}$		
I	45 — 55	5,30	0,0099	5,09	0,0073	0,21 ± 0,131	1,60 (n. s.)
	65 — 75	7,07	0,0211	6,38	0,0262	0,69 ± 0,217	3,18 (a, s.)
	90 — 150	8,96	0,0098	6,82	0,0082	2,14 ± 0,134	15,97 (a. s.)
II	45 — 55	6,13	0,0071	5,82	0,0069	0,31 ± 0,118	2,63 (s.)
	55 — 75	7,39	0,0126	6,94	0,0162	0,45 ± 0,169	2,66 (s.)
	90 — 150	8,26	0,0061	6,52	0,0069	1,74 ± 0,114	15,26 (a. s.)
III	45 — 55	5,95	0,0104	5,45	0,0064	0,50 ± 0,129	3,88 (a. s.)
	65 — 75	7,79	0,0248	6,30	0,0388	1,49 ± 0,252	5,91 (a. s.)
	90 — 150	9,78	0,0122	6,25	0,0108	3,53 ± 0,152	23,22 (a. s.)

Vê-se também que em qualquer das classes consideradas o valor da significância para a Região III é bastante superior ao das outras regiões, o que leva a admitir que a diferenciação em relação ao carácter «número de dentes» é mais marcada para essa região. Surge portanto a necessidade de aplicar o método das funções descriminantes, FISHER (1936), para sabermos mais rigorosamente se de facto essa região tem maior valor taxonómico, já nos elementos estudados, já porventura noutros caracteres ampelométricos.

As diferenças das médias com a indicação dos graus de significância são comparadas na fig. 1, para as diversas classes, marcadas em abcissas, e para as três regiões da fôlha. A sua análise e a dos histogramas das freqüências representados nas figs. 2 e 3, tornam mais claro o que acabamos de referir.

Devemos notar que para darmos maior uniformidade e tornarmos mais aparentes e comparáveis as diferenças marcadas nos histogramas da fig. 2, dividimos as escalas de freqüência: na classe 45-55 do híbrido *3306* por 1,5; na classe 65-75, do híbrido *3306* por 4, e do híbrido *101-14* por 2, visto serem menores os números de exemplares nessas amostras.

É interessante ainda apontar que para a classe 45-55 mm. e para a Região I, tanto no híbrido *Riparia* × *Rupestris 3306* como no *101-14*, a maior freqüência corresponde ao menor valor de número de dentes. Assim, nos dois híbridos, cêrca de 40 % dos casos têem 4 dentes, 30 % têem 5, 20 % 6 ou 7 e os restantes 10 % 8, 9 ou mais dentes. Isto quer dizer que, para essa região, por menores que sejam as dimensões da fôlha adulta, até ao limite considerado, 45 mm., existem sempre os dois dentes que correspondem a duas ramificações secundárias da largura principal mediana.

Para a Região II também não encontrámos menos de 4 dentes, que correspondem a 2 ramificações secundárias da primeira nervura principal lateral, porém, as maiores freqüências, nos dois híbridos e para a classe de menores dimensões, corresponderam a 6 dentes.

Já para a Região III, e na classe 45-55, encontrámos o algarismo 3 como menor valor do número de dentes, o que corresponde também a duas ramificações secundárias da nervura principal segunda lateral.

Portanto, até ao limite inferior considerado para comprimento da nervura principal mediana, 45 mm., as 5 nervuras principais da

fôlha, nos dois híbridos estudados, têem pelo menos duas ramificações secundárias.

Para darmos melhor ideia das diferenças que os números revelam, desenhámos na fig. 4 duas fôlhas adultas, em que o comprimento da nervura principal mediana é respectivamente de 50 e de 70 mm., constituídas por duas metades: as da esquerda referentes a fôlhas do híbrido *Riparia* × *Rupestris 3306;* as da direita do híbrido *101-14*. Na Estampa I, apresentamos duas fotografias de metades de fôlhas em crescimento, pertencentes aos mesmos híbridos e em que a nervura principal tem cêrca de 85 mm.

Vemos assim, que para o comprimento de 50 mm. as duas metades têem forma e recorte bastante próximos, que as distinções são maiores para o comprimento de 70 mm. e que elas se acentuam mais, para os dois caracteres, quando a fôlha ultrapassa essa dimensão. Pela observação da Estampa I podemos ainda estabelecer a Tabela III que nos mostra as principais diferenças de inervação entre as duas fôlhas fotografadas.

TABELLA III

Nervuras	N.º de ramif. de ordem imediatamente sup. que definem dentes	
	3306	101-14
Principal mediana	3	4
» 1.ª lateral	3	4
» 2.ª »	3	4
1.ª Ram. sec. da princ. 2.ª Lat.	2	3

OLIVIERI (1936) mostrou a diferença do número de dentes ao desenhar fôlhas dêsses dois híbridos, apresentando no desenho da fôlha do híbrido *Riparia* × *Rupestris 3309* ainda menor número do que no desenho da fôlha do híbrido *3306.*

Portanto, como o recorte da fôlha depende das condições fisiológicas internas, quando da sua diferenciação histológica, e as condições ecológicas que provocam a assimetria da fôlha se manifestam ulteriormente, êsse carácter «número de dentes» deve ser menos afectado por essas condições do que a forma da fôlha e a

forma dos próprios dentes, e, por conseqüência, menos sujeito a restrições na sua apreciação.

Com efeito, no que respeita à forma da fôlha, o método que nós indicámos, RODRIGUES (1939), por exemplo, só deve ser aplicado a fôlhas normalmente desenvolvidas e simétricas, por isso que, tanto o lado menos desenvolvido como aquele que atingiu um maior desenvolvimento se afastam da forma predeterminada na diferenciação: a organogenia normal da fôlha é alterada por condições que se manifestam ulteriormente.

CONCLUSÕES

Pelo que fica relatado, podemos concluir:

1.º — A forma e o recorte das fôlhas adultas, para uma mesma videira, são variáveis conforme as suas dimensões;

2.º — A situação da fôlha no sarmento, no ponto de vista da exposição, parece ter marcada influência na simetria do limbo; e portanto,

3.º — Só admitem rigorosa comparabilidade, para efeitos de apreciação taxonómica da forma e sobretudo para fins ampelométricos, as fôlhas de acentuada simetria;

4.º — O carácter «número de dentes» não deve ser influenciado por essas condições, dada a altura em que a diferenciação tem lugar;

5.º — Em relação a êsse carácter, as diferenças encontradas nos dois híbridos estudados são altamente significativas, nas três regiões consideradas, para as fôlhas adultas em que o comprimento da nervura principal mediana está compreendido entre 90 e 150 mm.

AGRADECIMENTO

Ao nosso colega Fernando de Abreu Carvalho Araújo, agradecemos o auxílio prestado na interpretação estatística dos números obtidos.

SUMMARY

The present paper deals with the taxonomic value of the vine leaf.

Some modifications of the form of the leaf due to physiological conditions are pointed out. Attention is called to the appreciation of the more or less marked differences which may be found in the leaves of the several varieties subject to cultivation.

A study of the taxonomic value of the number of teeth of the leaf in the separation of two hybrids: *Rip.* × *Rup. 101-14* and *Rip.* × *Rup. 3306* is carried out.

To that purpose 3 regions, taken independently, for each half of the adult leaf, were considered: the first, between the principal and first principal lateral veins; the second, between this one and the second principal lateral, and the third, including the whole of the leaf surface below the last one.

The material studied was separated, as regards the length of the principal vein, into three classes: 45-55 mm., 65-75 mm. and 90-150 mm..

For each class the differences of the means of the number of the teeth of the two hybrides in each of the three regions of the leaf considered were tested.

Conclusions:

1.°) The form and the margin of adult leaves belonging to the same vine are variable according to their dimensions.

2.°) The position of the leaf along the branch, as regards exposure, seems to have a marked influence in the symmetry of the limb.

3.°) Both, for the taxonomic appreciatiom of the form of the leaf and ampelometric purposes, particularly for the latter, only markedly symmetrical leaves can be compared.

4.°) The character «number of teeth» seems not be influenced by the previous conditions, due to the time at wich differentiation takes place.

5.°) In relation to that character, the differences found between the two hybrids studied, for the three regions considered in the fully grown leaves of the class 90-150 mm., are highly significant.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILLEAU, A.

1937 Diagrama ampelometrica e frunzei de Vitis vinifera ca element de diferentierea varietatilor. *An. Inst. Cerc. Agron. al Românei.* **9**, 286-311. Cit. in Rapp. au V.ème Cong. Inter. de la Vigne et du Vin. Lisbonne. 1938.

BRUNI, B.

1929 Lavoro preparatorio por la compilazione di una Ampelografia Italiana. *Nuovi Annali dell'Agricoltura. Roma.*

CROSS, G. L.

1938 A comparative histogenetic study of the bud scales and foliage leaves of Viburnum opulus. *Amer. Jour. of Bot.* **25** (4), 246-258.

DALMASSO, G.

1938 Établissement d'une methode générale d'étude des questions ampélographiques. Rapport général. *Rapp. au V.ème Cong. Intern. de la Vigne et du Vin. Lisbonne.* **1**, 19-37.

FISHER, R. A.

1936 The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Ann. of Eugenics.* **7** (2), 179-188.

HACKBARTH, J. und SCHERZ, W.

1935 Versuche über Photoperiodismus. II Das Vegetative Wachstum verschiedener Rebensorten. *Der Züchter* **7** (12), 305-321.

MOLON, G.

1906 *Ampelografia.* Ulrico Hoepli. Milano.

MOOG, M. H.

1938 Le point de vue Allemand. *Rapp. au V.ème Cong. Intern. de la Vigne et du Vin. Lisbonne.* **1**, 39-45.

NAVARRO, A. e VASCONCELOS, J.

1938 Caractéristiques ampélographiques et ampélotaxonomiques dans le genre *Vitis* L. *Rapp. au V.ème Cong. Intern. de la Vigne et du Vin. Lisbonne.* **1**, 66-68.

OLIVIERI, O.

1936 *Vitigni porta-innesti americani.* Ulrico Hoepli. Milano.

PEROLD, A. I.

1927 *A treatise on viticulture.* Macmillan & C.º L.td, London.

RAVAZ, L.

1902 *Les vignes américaines, Porte-greffe et Producteurs directs.* Coulet & Fils. Montpellier. G. Masson & C.e, Paris.

RODRIGUES, A.

1939 Sobre a caracterização das espécies e híbridos do género *Vitis*. Um novo método ampelométrico. *Agron. Lusitana*, **1** (3), 315-326.

1940 O crescimento foliar nalgumas espécies e híbridos do género *Vitis*. *Agron. Lusitana*, **2** (3), 253-285.

1941 Variações do recorte da fôlha da videira. *Agron. Lusitana*, **3** (3), 189-193.

TEODORESCU, I. C.

1938 Le point de vue Roumain. *Rapp. au V.ème Cong. Intern. de la Vigne et du Vin. Lisbonne.* **1**, 67-74.

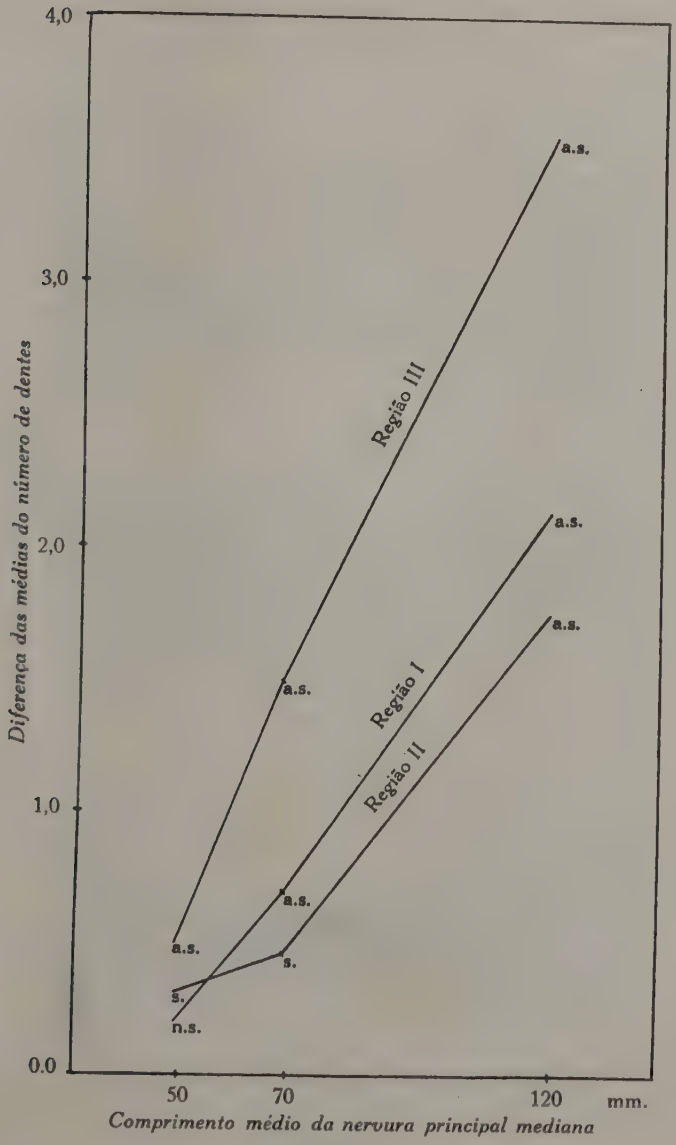

4,0
3,0
2,0
1,0
0.0
Diferença das médias do número de dentes
Região III
Região I
Região II
a.s.
a.s.
a.s.
a.s.
a.s.
s.
s.
n.s.
50
70
120
mm.
Comprimento médio da nervura principal mediana

Fig. 1

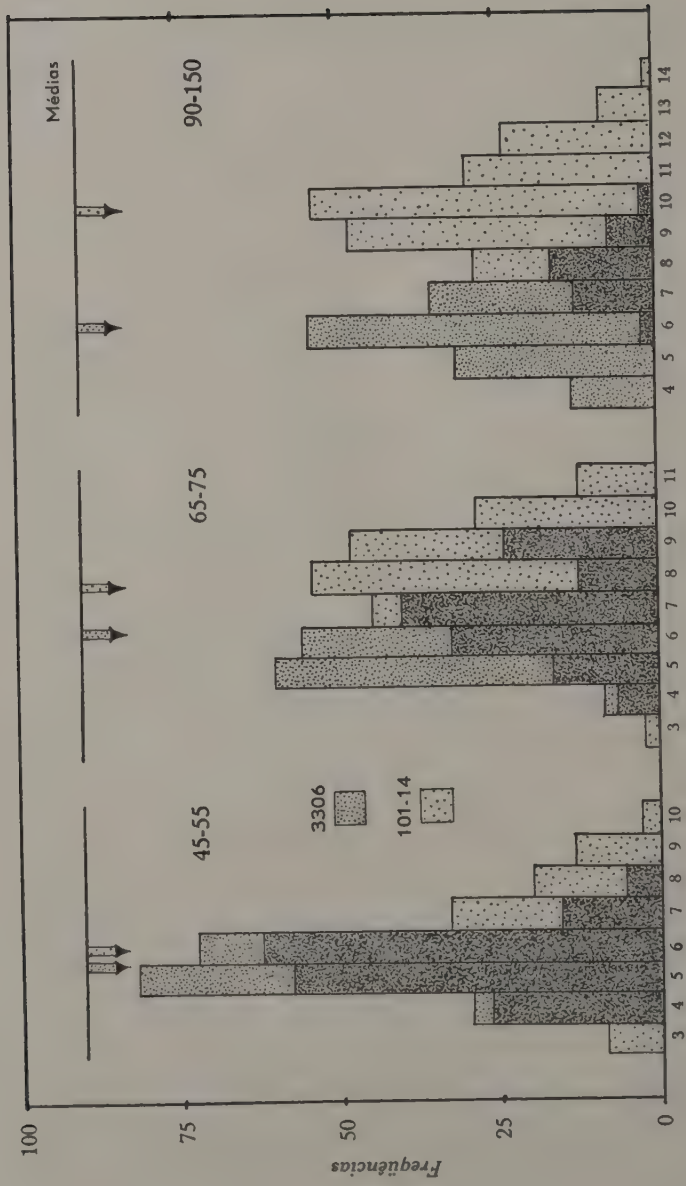

Médias
90-150
65-75
45-55
3306
101-14
Frequências
100
75
50
25
0
3 4 5 6 7 8 9 10
3 4 5 6 7 8 9 10 11
4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Número de dentes na Região III

Fig. 2

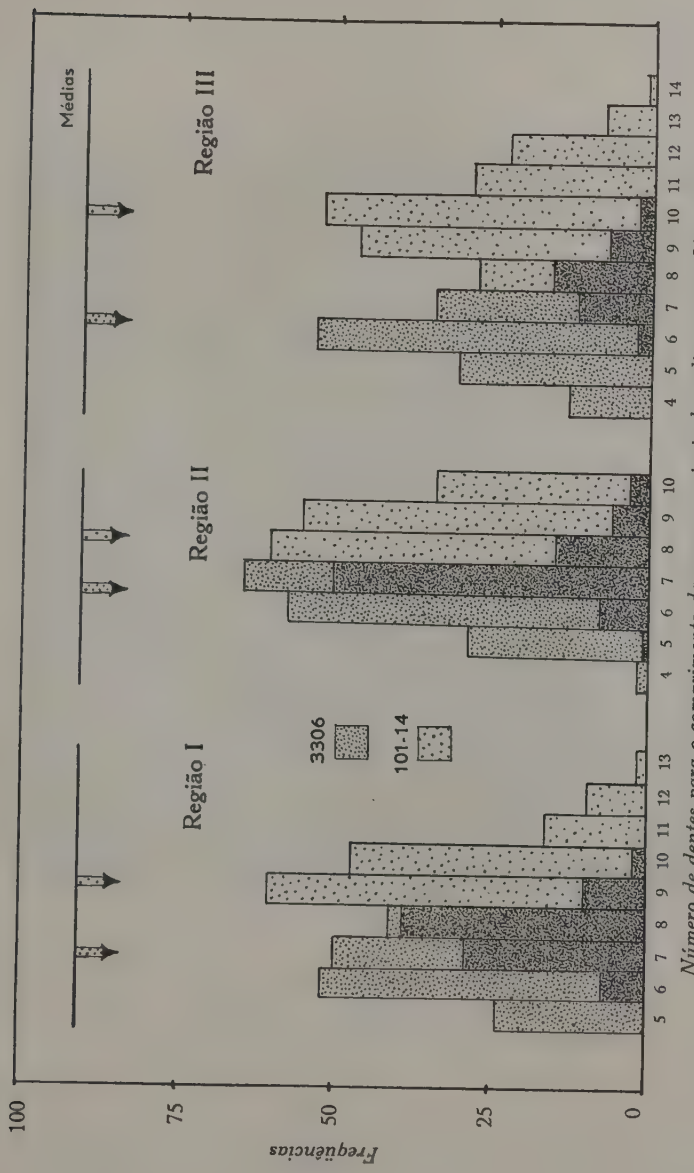
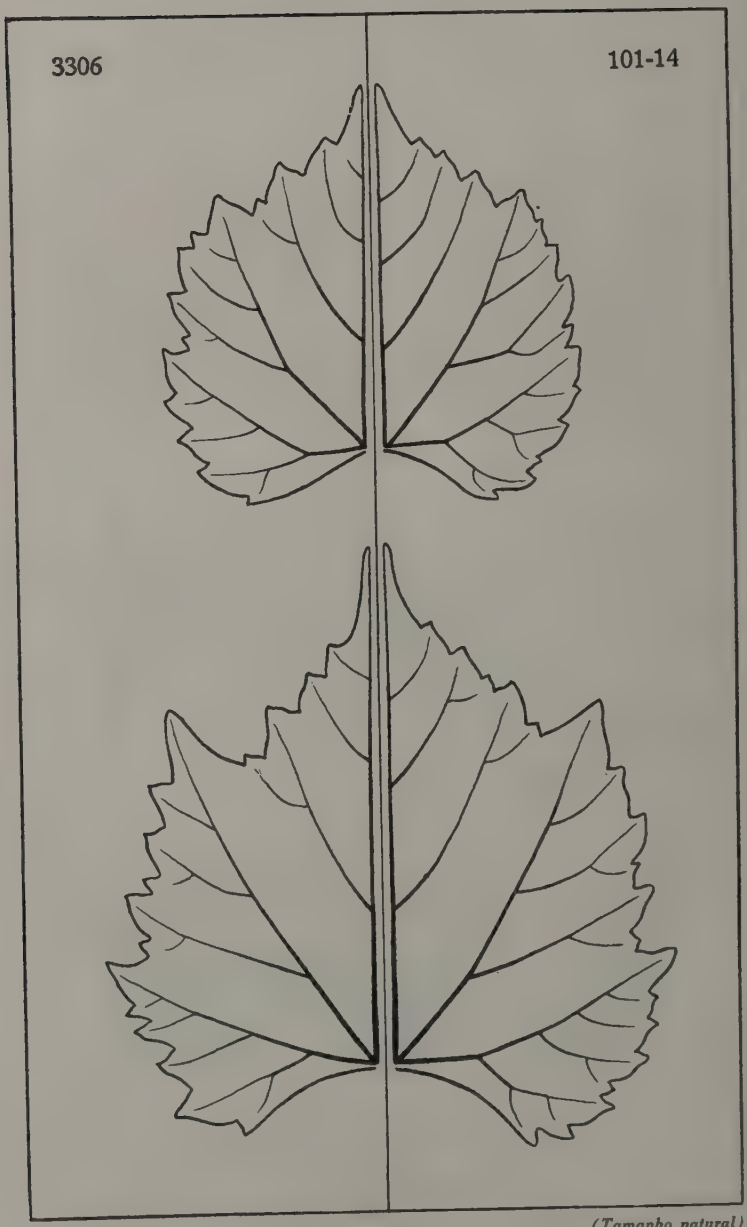

Médias
Região III
Região II
Região I
3306
101-14
Frequências
100
75
50
25
0
5 6 7 8 9 10 11 12 13
4 5 6 7 8 9 10
4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Número de dentes para o comprimento da nervura principal mediana entre 90 e 150 mm.

Fig. 3



(Tamanho natural)

Fig. 4

3306

101-14

O PROBLEMA DA FRAGMENTAÇÃO CROMOSÓMICA, OPERADA PELOS RAIOS X, ESTUDADO NO *TRITICUM MONOCOCCUM*

POR *A. CÂMARA*
(DA ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL)

HÁ muito que o problema da fragmentação cromosómica, operada pelos raios X, preocupa os citologistas e os genetistas. Pode dizer-se que é já considerável a soma de trabalhos publicados sôbre o assunto e que o interêsse não cansou, pelo contrário se renova incessantemente com a descoberta de novos métodos ou de novos aspectos da questão.

Não é só a ciência pura que tem a ganhar com o esclarecimento desta variação induzida artificialmente, é também a ciência aplicada, o melhoramento de plantas, que espera obter das anomalias cromosómicas, provocadas pelos agentes físicos, indivíduos de aprêço, que possam aproveitar-se depois na prática cultural.

Esclarecer a forma como os cromosomas se rompem, quando submetidos aos raios X, é contribuir para o conhecimento do processo porque se efectuam as variações estruturais e será talvez a forma de compreender a organização complexa dos cromosomas.

Embora se tenham realizado numerosas investigações sôbre a produção de translocações e intercâmbios segmentários, bem como sôbre inversões, duplicações e deficiências, ainda não há uma corrente uniforme de opinião acêrca da maneira como tais arranjos se executam. Não há a certeza de que as soldaduras se façam sempre a seguir aos rompimentos, como também se não pode afirmar que elas se dêem invariàvelmente antes dos cromosomas experimentarem os cortes. Muitas das experimentações fornecem resultados que confirmam a primeira concepção, mas algumas outras mostram que a segunda não pode excluir-se.

Também não há um conhecimento exacto da maneira porque se dão as roturas dos cromosomas. Conhecendo-se hoje alguma coisa da estrutura dos cromonemata, quando se estudam os efeitos dos raios X ficamos indecisos sem saber a que atribuir os

seus rompimentos, ignorando-se qual é a natureza da energia física que êles requerem, se é a absorção dos *quanta*, se a passagem dos electrões, se as ionizações.

Por outro lado, enquanto alguns experimentadores afirmam que os cromosomas não teem zonas mais susceptíveis, onde as roturas se deem de preferência, e apresentam em reforço desta afirmação resultados bastante persuasivos, outros genetistas ou citologistas declaram o contrário, acentuando que há regiões diversas, sob o ponto de vista de vulnerabilidade aos raios X, que existem zonas extremamente susceptíveis e outras de resistência elevada. Em apoio destas declarações apresentam elementos aparentemente convincentes, colhidos em cuidadosas investigações.

LEWITSKY e SIZOVA, por exemplo, em 1934 e 1935, declaravam que sob a influência dos raios X, relativamente à fragmentação, há uma certa especificidade nas várias regiões dos cromosomas. PATTERSON, STONE, BEDICHEK e SUCHE apresentavam naquele ano demonstrações genéticas de ter ocorrido maior número de roturas nos cromosomas irradiados da *Drosophila melanogaster*, nas regiões proximais e distais. E nós próprios (CÂMARA, 1935) publicávamos resultados de observações feitas sôbre mitoses de *Triticum monococcum*, submetidas a raios X, que provavam existir, para os seus cromosomas, regiões mais susceptíveis, as quais então denominámos *zonas críticas de rotura*. Ainda mais tarde relatámos outros resultados, tanto em *Aloë arborescens* (CÂMARA, 1936) como na *Vicia faba* (CÂMARA e VALADARES, 1938), que corroboravam tal conclusão.

Enquanto esta série de trabalhos parecia fixar as atenções de modo concordante, para um facto positivo da constituïção cromosómica, outros investigadores, servindo-se dos cromosomas das glândulas salivares da *Drosophila*, tirando partido das múltiplas vantagens que proporciona êste material, iam chegando a conclusões quási tôdas contrárias aquele ponto de vista. Assim, num trabalho de BAUER, DEMEREC e KAUFMANN (1938) mostrava-se que nos cromosomas da *Drosophila melanogaster* não há zonas especiais, onde os rompimentos se deem de preferência. Quando muito se podia referir que a heterocromatina concentrava um maior número de roturas.

Sem embargo persistia a incerteza, pois outros citologistas, trabalhando com plantas, continuavam a encontrar aquela especificidade atraz aludida, em que o número de rompimentos era mais considerável

em certas secções, dos cromosomas, que noutras. A secção visinha dos centromeras, por exemplo, era apontada em muitos casos como uma dessas zonas mais vulneráveis. GUSTAFSSON (1936) sugeria, porém, que a concentração de roturas, na região do centromera, poderia resultar apenas dum atraso no fendilhamento dos cromosomas nessa zona. Esta opinião suscitou, no entanto, dúvidas, visto que DARLINGTON provou (1937) que se dá a condensação precoce dos cromosomas na profase, em vários géneros de plantas, na zona de ligação ao fuso, e que SAX e MATHER mostraram (1939), por sua vez, que, nos *loci* próximais de *Tradescantia*, se se verifica fendilhamento progressivo, êle principia justamente a partir do centromera. Segundo êstes últimos autores as regiões proximais mostram maior freqüência de roturas que as regiões distais, facto que êles atribuem à maior torsão naquelas zonas.

SAX confirmou posteriormente esta afirmação, respeitante ao maior número de roturas nas zonas proximais dos cromosomas de *Tradescantia* (1939), conquanto notasse que as roturas iniciais nos cromosomas dos microsporos se distribuissem ao acaso.

No último Congresso de Genética (1939) duas opiniões apareceram a favor da existência de regiões mais susceptíveis. A primeira de KAUFMANN filiava-se no estudo da distribuição de roturas ao longo do cromosoma X, nas glândulas salívares da *Drosophila melanogaster*. Cêrca de 600 roturas se observaram em obediência ao mapa de BRIDGES, notando-se que cêrca de 1/3 dessas roturas se davam na região heterocromática e que muitas outras se encontravam, com freqüência relativamente elevada, em determinadas zonas consideradas eucromáticas, facto que levou KAUFMANN a afirmar a possibilidade dêsse acréscimo de rompimento indicar a presença, nas regiões referidas, de secções de heterocromatina intercalar.

A segunda opinião era a nossa (CÂMARA, 1939), resultante de observações de cromosomas meióticos de *Aloë arborescens*, efectuadas principalmente sôbre medições de fragmentos destacados depois da irradiação. Segundo elas notava-se maior susceptibilidade em certas extensões, o que parecia mostrar existirem na verdade *regiões críticas de rotura*.

Enfim, pelo que se relatou, verifica-se que as opiniões se dividem. De que lado está a razão, não é possível prever por enquanto. Poderá mesmo acontecer que a discrepância de resultados provenha mais da diversidade dos materiais usados na experimentação,

da constituïção diferente dos cromosomas ensaiados, da própria dosagem empregada dos raios X, do que da deficiência dos métodos ou da observação. Parece, contudo, que esta questão tem o mais alto interêsse, pois se fôsse possível definir, sempre, as zonas de maior vulnerabilidade dos cromosomas, dar-se-ia naturalmente uma demonstração de grande valor sôbre o heterogeneidade dos cromonemata.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Êste trabalho realizou-se sôbre uma linha de *Triticum monococcum* L. variedade *vulgare* Körn., cultivada na Estação Agronómica Nacional. A dosagem adoptada de raios X foi de 1000 r, 2000 r e 3000 r, a 115 kv., 5 mA, a 13,5 cm. de distância, com filtro de alumínio de 1 mm.

Afim de se obter vasto material — como relatámos num trabalho recente (CÂMARA, 1941) — de cada vez irradiavam-se 100 sementes, mantidas em posição numa placa Petri, graças a um disco de celuloide onde se haviam aberto 100 orifícios com as dimensões das sementes. Os grãos podiam assim conservar-se em posição vertical, com os embriões dirigidos à fonte da irradiação, à distância acima referida. Seguidamente metade das sementes era deposta em vasos de areia e outra metade levada para outras placas Petri, à razão de 10 sementes por placa, a fim de se obterem as radículas em boas condições durante os dias necessários.

Diàriamente, após a irradiação, foram-se colhendo radículas, as quais se fixavam em diversos fixadores, mas principalmente em Lewitsky 6:4, Medium Flemming e Benda sem ácido acético. Em muitos casos adoptou-se a técnica dos esfregaços de Heitz, apenas modificada com o tratamento prévio das sementes em hidrato de cloral (CAMARA e COUTINHO, 1939).

A medição dos cromosomas, bem como dos fragmentos, fez-se segundo os métodos seguidos no nosso laboratório e que se encontram relatados em trabalho anterior (CAMARA, 1934).

Adoptou-se o *Triticum monococcum*, para estas pesquisas, não só por ser muito nosso conhecido, sôbre o qual já havíamos trabalhado nesta matéria, mas se verificou que com os métodos seguidos se obtinham metafases muito claras, de cromosomas muito nítidos, de fácil desenho e medição, sendo em muitos casos possí-

vel identificar os elementos cromosómicos donde sairam os fragmentos, e até ajuïzar das translocações que êles sofreram. Por outro lado, como êste trigo tem dois cromosomas SAT (SMITH, 1936, PATHAK, 1939), pareceu que seria ainda interessante estudar particularmente o comportamento dêstes dois cromosomas, perante os raios X, uma vez que se determinasse uma técnica favorável à sua diferenciação. Ora o método de HEITZ é extremamente propício à identificação dêstes elementos, razão porque uma parte importante das nossas observações assentou sôbre êles.

Afigurava-se-nos, de princípio, extremamente arriscado pronunciarmo-nos sôbre os *loci* exactos de rotura, uma vez que os cromosomas dêste trigo são muito semelhantes, todos isobraquais e de pequenas diferenças de extensão. Mas desde que se passou a distinguir bem os dois cromosomas SAT, que para êste estudo chamaremos SAT 1 o mais curto e SAT 2 o outro, acreditámos que estas dificuldades se atenuariam. Desta sorte quási todo o nosso estudo considerou principalmente êstes dois tipos de cromosomas. Nos restantes procuraram-se apenas as variações que pudessem mostrar, nos casos de translocações, quais os cromosomas que mais freqüentemente funcionavam de receptores ou de dadores.

As determinações dos pontos de rotura fizeram-se principalmente à custa das medidas dos fragmentos, dedicando-se especial interêsse a essas medidas quando os fragmentos resultavam claramente dos cromosomas SAT, e sobretudo dos seus braços distais — para se poder ter sempre a certeza de que os fragmentos haviam saído dêsses cromosomas. Só em certos casos se poude acumular elementos de vários rearranjos. A-fim-de encontrar o maior número de fragmentos e portanto mais esclarecimentos sôbre as posições das roturas, antecipando-nos aos efeitos dêsse processo de reparação, a que os cromosomas posteriormente se submetem, depois de passado algum tempo, sôbre o tratamento, escolheram-se células com 24 a 48 horas após a irradiação, de harmonia com as indicações fornecidas por FABERGÉ (1939).

3. OBSERVAÇÕES

Os fragmentos que se podem observar, depois de 24 a 48 horas, após a irradiação, são muito freqüentes. As figuras bem como as

microfotografias que acompanham êste trabalho mostram alguns dos numerosos casos estudados

Os fragmentos mostram-se com dimensões muito diversas, desde muíto pequenos, como os representados nas figs. 1, 4 e 6, que parecem destacados das zonas distais dos cromosomas, a

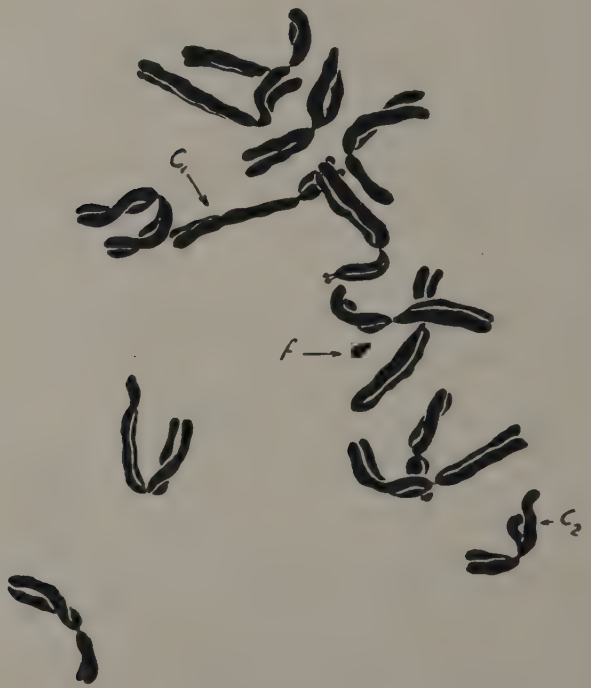


Fig. 1

muito grandes, como nos casos das figs. 2, 3 e 5, em que parecem, por vezes, braços inteiros de elementos isobraquiais.

Verifica-se, depois de se observarem numerosas fragmentações, que há um grupo de fragmentos, muito importantes, daquele primeiro tipo, presumivelmente resultantes de ligeiras decapitações, e outro sensivelmente igual do segundo tipo, em que os fragmentos provêem naturalmente de roturas junto dos contromeras. No primeiro caso, êsses pequenos fragmentos desaparecem ràpidamente, visto que já se não veem depois de três dias sôbre a irradiação.

No outro caso, porém, os cromosomas, que ficam, como é intuitivo, com aspecto cefalobraquial, ou com constrição aparentemente terminal, persistem, podendo manter-se essas estruturas atravez de algumas gerações celulares.

A apreciação dos *loci* exactos das roturas, em cromosomas que sofreram a irradiação hà mais de dois dias, é por vezes muito dificil, por se haver já dado êsse processo de reparação, a que

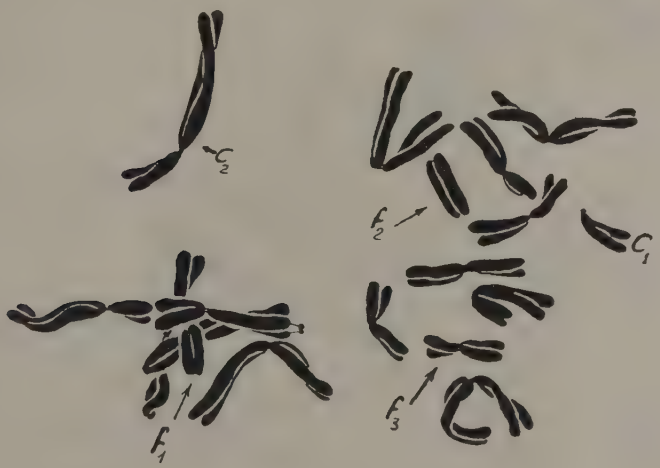


Fig. 2

aludimos, e a que os vários experimentadores se teem referido, que conduz a fusões de vária ordem, sem que se possa assegurar, então com rigor, o ponto por onde se deram os cortes e as conseqüentes soldaduras.

Noutras ocasiões, embora haja translocações evidentes, sempre ficam dos cromosomas dadores uns segmentos que nos habilitam a dizer quais foram os pontos por onde se efectuaram os cortes. Tal é o caso da microfotografia 2. Veja-se que nessa metafase há um cromosoma SAT, marcado como C 1, que funcionou de receptor, conforme está apontado, com a seta descritiva da translocação que se deu, alojando um fragmento muito importante, quási um braço inteiro, dum cromosoma do par mais pequeno, do que chamamos VII.

Deverá notar-se que, neste caso, não pode haver quaisquer dúvidas. Os cromosomas desta placa foram todos medidos, averi-

guando-se que o SAT, apontado como receptor, é mais comprido, aproximadamente em 2 μ, que a medida que lhe competia. O seu homologo, C 2, por um acaso feliz, como para testemunhar imediatamente a verdade do que se afirma, apresenta-se mesmo junto do cromosoma citado, proporcionando assim uma fácil comparação,

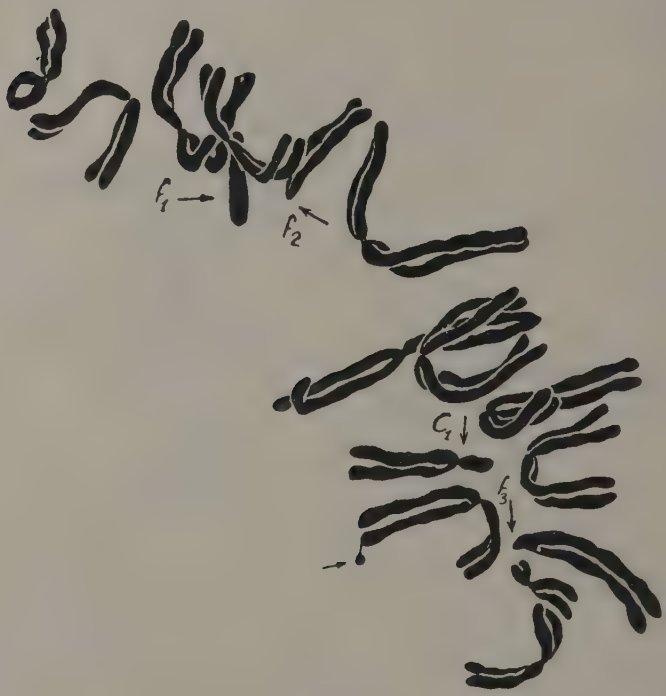


Fig. 3

que não deixa lugar a discussões. Como fácilmente se pode ver, C 1 é mais comprido que C 2, num segmento aproximadamente igual a um braço dum cromosoma. Que C 1 é homólogo de C 2 parece provar-se com o facto de ambos serem satelizados, do mesmo tipo SAT 1, e de na mesma célula estarem visíveis os cromosomas do outro par SAT 2 (marcados igualmente com pequenas setas). Mesmo sem medições, qualquer obervador, olhando esta placa de metafase e contando 13 cromosomas e um fragmento (f), vendo demais que um cromosoma SAT é muito mais comprido que o seu presumivel

homólogo, com cêrca de 1/3 a mais, logo atribuiria um tal alongamento a uma translocação. Ainda prontamente poderia descobrir que êsse alongamento provinha do cromosoma receptor haver recebido do outro cromosoma, de que resta um simples fragmento (f), uma longa secção. Ora as nossas medições provaram que assim é e que não havia outras alterações perceptíveis nos restantes elementos.

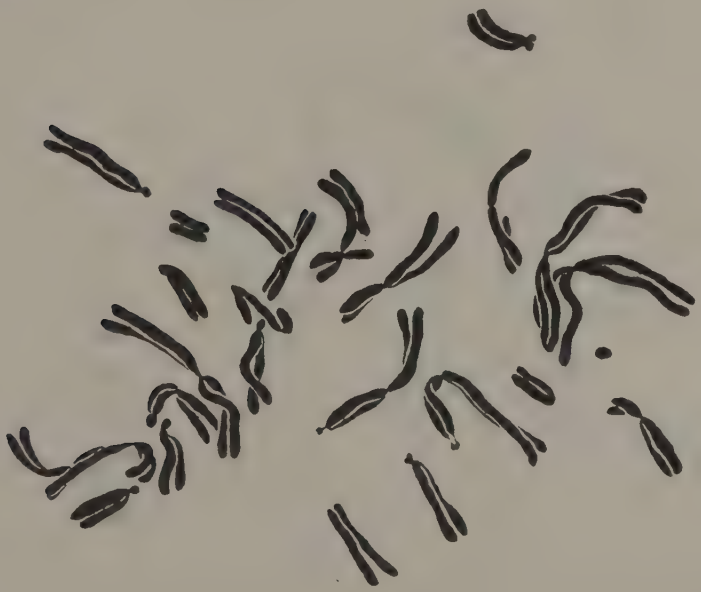


Fig. 4

Êste é mais um caso em que os rompimentos se deram, dum lado, no cromosoma receptor, na região distal, do outro, no cromosoma dador, na zona proximal. Êste caso não foi o único observado. Muitos outros se encontraram, como adiante apontaremos, mas sem dúvida alguma êste foi o mais eloqüente.

Claro que nem todos os exemplos estudados foram fáceis de interpretar. Houve metafases em que os rearranjos eram muito complicados. Na da microfotografia 1, em que se vêem 13 cromosomas e um triplice anel, não é clara a série de transformações que se operaram. Só depois de medições muito cuidadosas se poude con-

cluir que todos os cromosomas estão encurtados, parecendo que muitos contribuiram por rearranjos complexos, para a formação daquela figura singular do triplice anel.

Na microfotografia 3, apezar duma intensa fragmentação, pode apreciar-se a produção de alguns cromosomas cefalobraquiais, por rompimentos das regiões proximais. Um deles, mesmo, representado como Fl, proveniente dum cromosoma SAT, é muito claro, e, como por sorte está atravessado sôbre o seu homologo, pode por comparação inferir-se o ponto por onde se rompeu.

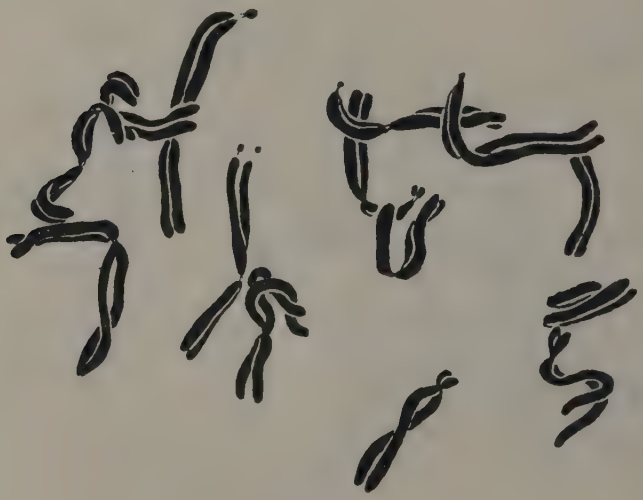


Fig. 5

Na microfotografia 4, pelo contrário, é impossível dizer por onde se deram as roturas, embora se tenha a certeza de que houve numerosas translocações, pois a medição provou que havia cromosomas muito compridos, como C_1, e outros excessivamente curtos, como C_2, não existentes nos cariotipos normais de *Triticum monococcum*, que não podem atribuir-se senão a rearranjos de vária ordem.

Enfim, o que se diz parece já suficiente para haver descrito, em linhas gerais, o caminho seguido para a determinação dos pontos de rotura.

O trabalho consistiu, essencialmente, repetimos, em medir todos os cromosomas SAT afectados, ou os segmentos, que apareciam, em conseqüência das fragmentações que êles experimentassem. Como correcção, para que se pudessem comparar as várias medidas dos cromosomas, procurou-se estabelecer, para cada

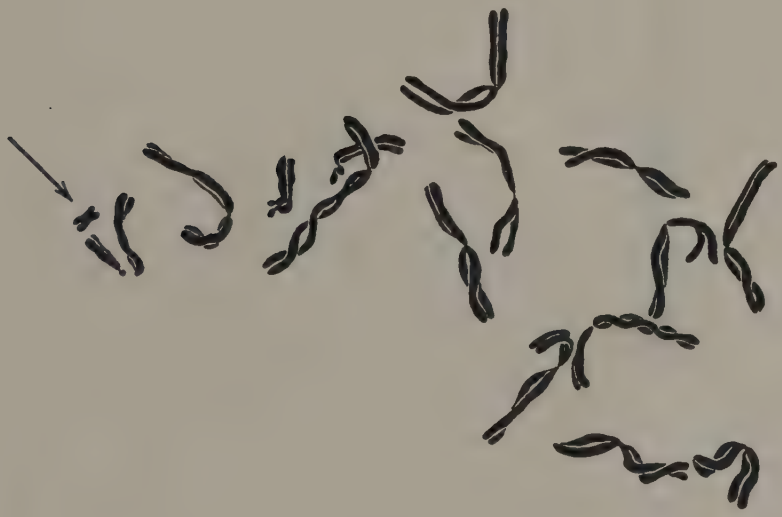


Fig. 6

celula observada, o grau de contracção sofrido. Êsse coeficiente foi deduzido da extensão denotada, para cada celula — pelos cromosomas SAT, fàcilmente diferençáveis, e sôbre os quais não podia haver dúvidas. Corrigidos êsses comprimentos, julgou-se preferível, como dissemos, concentrar as atenções apenas sôbre os casos de roturas ocorridos nos braços distais, dos referidos cromosomas, de modo a ter-se sempre a certeza de bem identificar os cromosomas analizados.

Os números de cortes observados, obtidos através de fragmentações, são os que se referem gràficamente na figura 7. Representam-se em ordenadas os números de fragmentos e em abscissas os seus comprimentos em microns.

No cromosoma SAT 1, o satelisado mais curto e de satelite

Fig. 7

de maiores dimensões, em que o braço observado não chega a ter 2,5 microns de comprimento, nas médias 2,4 μ, encontraram-se as seguintes roturas:

N.º de roturas	Nivel das roturas, determinado pela distância ao extremo dos cromosomas (depois de corrigida a distância com o coeficiente de contracção)
16	0.3
13	0.6
6	0.9
4	1.2
2	1.5
5	1.8
14	2.1

O cromosoma SAT 2 tem de comprimento, nas médias, para o braço estudado, 3,2 μ.

As roturas encontradas nas mesmas condições do caso anterior, determinadas da mesma forma, foram as seguintes:

N.º de roturas	Nivel das roturas, determinado pela distância ao extremo dos cromosomas (depois de corrigida a distância com o coeficiente de contracção)
6	0.4
12	0.8
9	1.2
5	1.6
4	2.0
7	2.4
11	2.8

Como se verifica, parece haver, tanto no cromosoma SAT 1 como no SAT 2, dois pontos de maior freqüência de rompimentos operados pelos raios X: um na zona distal, outro visinho do centromera. O primeiro *ponto crítico de rotura* fica, no entanto, no SAT 1, mais próximo da extremidade. Quanto ao segundo ponto, os níveis de corte aparecem sensivelmente no mêsmo *locus*, em relação ao centromera, no SAT 1 e no SAT 2.

Como se vê, também há um abaixamento muito significativo, na freqüência dos cortes, na zona intermédia.

Parece, ainda, que o primeiro cromosoma tem maior susceptibilidade perante os raios X, pois o número de roturas observadas foi mais alto nas referidas zonas críticas de rotura.

No gráfico encontram-se representadas claramente estas dife-

renças. Os pontos mencionados, de maior susceptibilidade, acham-se assinalados com pequenas setas sôbre os cromosomas que se desenharam superiormente na escala adoptada para os gráficos.

4. DISCUSSÃO

Os genetistas teem procurado resolver os múltiplos problemas dependentes da rotura dos cromosomas por lados muito diferentes. Pode dizer-se, porém, que eles ficam relacionadas a: (1) determinação das posições das roturas, (2) efeitos de dosagem e proporcionalidade existente entre esta e o número de roturas, (3) efeitos da intensidade e do comprimento de onda, (4) efeitos das temperaturas e fragmentação das dosagens e (5) freqüência das diversas variações estruturais.

O nosso ponto de vista prende-se só ao primeiro aspecto, sem pretensões a estabelecer quaisquer correlações.

As conclusões dêste trabalho teem de se apresentar com alguma reserva, pois os métodos empregados ofereceram tais dificuldades que é muito possível tenhamos incorrido em vários êrros. Por outro lado, e a agravar a situação, o número de cortes estudados foi bastante baixo. Contudo, não julgamos que com o material adoptado e com as precauções seguidas seja fácil elevá-lo a cifras consideràvelmente superiores. Com efeito, estudaram-se muitas metafases, para se obterem apenas algumas dezenas em que os cromosomas SAT estivessem bem visíveis, e onde se verificassem rompimentos nos seus braços distais. Frizamos que a observação foi particularmente difícil e penosa, obrigando a muitas projecções e medições de cromosomas. As linhas dêste escrito não dão mesmo de longe uma ideia da complexidade que ofereceu tal determinação. Quere-nos parecer, todavia, que no estado actual dos nossos conhecimentos, apesar dos êrros possíveis do método, e da sua dificuldade, ainda êle é o mais favorável, de todos os usados até agora, em material vegetal.

É admissível que possa ter havido eliminação de alguns casos duvidosos, por os cromosomas SAT não estarem bem diferenciados, ou por haverem sofrido rearranjos, e que isso originasse alguma

modificação à curva de freqüência das roturas. Todavia, devemos acentuar que se tomou a precaução de trabalhar com material que ainda não deveria ter experimentado, pelo menos em grande escala, o processo de reparação a que atrás aludimos. Enfim, afigura-se-nos que os elementos concluídos, a despeito das imperfeições inevitáveis do método que se adoptou e que estamos prontos à admitir que existam, merecem apesar de tudo alguma atenção.

Há ainda um facto que deve ponderar-se: segundo KOSTOFF (1938), as regiões próximas do centromera e as regiões vizinhas dos topos dos cromosomas de *Triticum monococcum* são regiões heterocromáticas. Ora a coïncidência das zonas, tomadas por êste autor, como sendo as de heterocromatina, com as *zonas críticas de rotura*, que determinámos, é de certa maneira curiosa, pois tem-se algumas vezes afirmado que as regiões heterocromáticas são regiões de maior susceptibilidade aos raios X.

O presente trabalho não pretende confirmar êste facto; a isso se referia um trabalho nosso anterior (CÂMARA 1941). Não aspira sequer a delimitar as zonas de heterocromatina nos cromosomas do trigo ensaiado. O objectivo é apenas juntar mais alguns elementos que demonstrem haver diferente vulnerabilidade nos cromosomas do *Triticum monococcum*, servindo-nos agora de dois cromosomas precisos — os satelizados.

Os ensaios mostraram haver, como dissemos, dois pontos de maior susceptibilidade nos braços distais, tanto do cromosoma SAT 1 como do SAT 2.

Mesmo que se duvidasse do rigor das medidas, decerto afectadas por várias causas de êrro, a observação de numerosas metafases, com a da fotografia 3, repetindo com grande insistência o tipo de cromosoma cefalobraquial (ali representado como Fl), levaria a concluir que, de facto, nessa região vizinha do ponto de ligação ao fuso, há uma zona crítica de rotura. A outra região, porém, a distal, é mais difícil de determinar, pois fica sempre dependente de medições, muitas vezes provocadas pela presença suspeita de pequenos fragmentos, atribuíveis à decapitação dos cromosomas. Em conclusão, se essa região crítica de rotura, visinha das extremidades, pode suscitar algumas dúvidas, a outra, que não carece de métodos detidos, para ser prontamente reconhecida, parece-nos que não deve provocar qualquer discussão.

É curioso, todavia, frizar que embora êsse rompimento junto

do centrómera seja muito freqüente, os cromosomas cefalobraquiais não persistem, por muito tempo, fazendo acreditar que a potência de soldadura nessa zona é muito elevada. Em contrapartida podem encontrar-se, mesmo depois de muitas gerações celulares, cromosomas SAT ligeiramente encurtados, devido certamente à decapitação na zona de rotura distal. Parece por isso que aí a potência de soldadura é mais fraca. É facto digno de menção o nunca termos observado, no nosso material de *Triticum monococcum* em cultura, depois de irradiado, um único caso de cromosoma cefalobraquial, e termos encontrado, bastantes vezes, cromosomas encurtados.

Também parece deve chamar a nossa atenção o não haver em qualquer espécie de *Triticum* um único cromosoma cefalobraquial, e para o caso de *Triticum monococcum* — o que está em causa — haver certa diversidade, no comprimento dos cromosomas SAT, para algumas das suas variedades (CÂMARA, não publicado).

SUMÁRIO

O presente trabalho dá mais uma demonstração de que existem, nos cromosomas, quando submetidos a raios X, zonas críticas de rotura. Utilizou-se, como material, sementes de *Triticum monococcum* L. var. *vulgare* Körn, duma linha cultivada na Estação Agronómica Nacional, submetendo-se a irradiações de 1000 r, 2000 r e 3000 r, a 115 kv, 5 mA, a 13,5 cm. de distância com filtro de alumínio de 1 mm.

Descrevem-se os métodos usados, justifica-se porque se adoptou êste material de trigo e porque se restringiu a observação dos cortes operados, sôbre os cromosomas, aos respeitantes aos dois cromosomas SAT.

Enumeram-se os vários tipos de fragmentações observadas, e refere-se o método adoptado, para definir, com certo rigor, os *loci* de rotura.

Depois de numerosas e detidas observações, completadas com medições dos fragmentos e dos cromosomas afectados, conseguiram-se traçar uns gráficos que traduzem as freqüências das roturas, ao longo dos braços distais dos dois cromosomas SAT (fig. 7).

As conclusões são as seguintes:

CONCLUSÕES

1.— Os braços distais dos cromosomas SAT do *Triticum monococcum* apresentam, sob o efeito dos raios X, duas *zonas críticas de rotura.*

2.— Uma das zonas referidas encontra-se junto do extremo do cromosoma e a outra próximo do centromera.

3. — A fragmentação mais perceptível é a que resulta do corte junto desta última região, visto liberar cromosomas do tipo cefalobraquial, fàcilmente distinguíveis dos outros que são todos isobraquiais.

4.— O cromosoma SAT 1 parece ter maior susceptibilidade, perante os raios X, do que o SAT 2. Parece ainda que naquele a zona distal é mais vulnerável que neste.

5.— A ausência de cromosomas SAT, do tipo cefalobraquial, induzidos pelos raios X, depois de muitas gerações celulares, aliada ao facto de persistirem cromosomas SAT de braços distais encurtados, parece indicar que a zona vizinha do centromera tem maior potência de soldadura que a zona distal.

SUMMARY

The present work gives another proof of the existence of critical regions of rupture in chromosomes subjected to the action of X-rays. Seeds of *Triticum monococcum* L. var. *vulgare* Körn. from a pure line grown in Estação Agronómica Nacional were used and subjected to X-raying, in dosages of 1,000 r 2,000 r and 3,000 r, at 115 kv, 5mA, at a distance of 13.5 cm., with an aluminium filter of 1 mm.

Several types of fragmentation are pointed out and a reference is made of the methods followed to define with a certain accuracy the *locci* of rupture. Many and accurate observations completed with measurements of both the fragments and the affected chromosomes made it possible to present in some graphs the frequencies of the ruptures along the distal arms of the two SAT-chromosomes (Fig. 7).

The conclusions are as follows:

1.— The distal arms of the SAT-chromosomes from *Triticum monococcum* show, when treated by X-rays, two regions of rupture.

2.— One of these regions is located at the end of the chromosome and the other near the centromere.

3.— The most perceivable fragmentation results from the rupture of the chromosomes near the centromere as it liberates chromosomes of the cephalobrachial type, easily distinguishable from the others which belong all to the isobrachial type.

4.— The SAT 1 chromosome appears to be more susceptible to the X-rays than the SAT 2 chromosome. Besides it appears that in the former the distal portion is more vulnerable than in the latter.

5.— The lack of the cephalobrachial type in SAT-chromosomes treated by X-rays, after many cellular generations, together with the existence of SAT-chromosomes with shortened distal arms accounts for the higher fusion power in the portion near the centromere than in the distal one.

BIBLIOGRAFIA

BAUER, H., DEMEREC, M., and KAUFMANN, P. P.

1938 X-ray induced chromosomal alterations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **23**: 610-630.

CÂMARA, A.

1934 Um estudo citológico do *Triticum monococcum* L. *Ann. Inst. Sup. Agron.* **6** (2): 5-36.

1935 Efeitos dos raios-X nos cromosomas do *Triticum monococcum*. Sua análise na apreciação da filogenia do trigo. *Ann. Inst. Sup. Agron.* **7**: 5-38.

1936 Eléments pour l'étude de la fragmentation chromosomique. *Rev. Agron.* **24** (2): 5-7.

1939 The effect of X-radiation on the chromosomes of *Aloë arborescens*. *Proc. VII Inter. Genet. Cong.*: 83.

1941 A fragmentação dos cromosomas, pelos raios-X, no *Triticum monococcum*. *Actas I Cong. Nac. Cien. Natur.* (No prélo).

CÂMARA, A. e VALADARES, MARIA L.

1938 Sur l'éxistence de régions favorables à la rupture chromosomique. *Arch. portugaises des sciences biologiques.* **4** (2): 237-250.

FABERGÉ, A. C.

1939 An experiment on chromosome fragmentation by X-rays in *Tradescantia*, *Proc. VII Inter. Genet. Cong.*: 118.

KAUFMANN, B. P.

1941 Distribution of induced breaks along the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc. VII Inter. Genet. Cong.*: 172.

KOSTOFF, D.

1938 A contribution to the chromosome structure and behaviour. *La Célule* **47** (2) : 219-226.

LEWITSKY, C. and SIZOVA, M.

1934 On regularities in chromosome transformations induced by X-rays. *Comp. rend. Acad. Sci.* URSS. **4** (1-2) 84-87.

1935 Further studies on regularities in chromosome transformations in *Crepis capillaris* induced by X-rays. *Comp. rend. Acad. Sci.* URSS. **4** (1-2) 71-75.

PATHAK, C. N.

1939 Studies in the cytology of *Crocus* and cereals with special reference to satellites and nucleoli. *Proc. VII Inter. Genet. Cong.:* 232.

PATTERSON, J. T., STONE, W., BEDICHEK, S., and SUCHE, M.

1934 The production of translocations in *Drosophila. Amer. Natur.* **48**: 359-369.

SMITH, L.

1936 Cytogenetic studies in *Triticum monococcum* L. and *T. aegilopoides* Bal. *Univ. Missouri Agr. exp. Sta. Res. Bul.* **248**: 1-39.

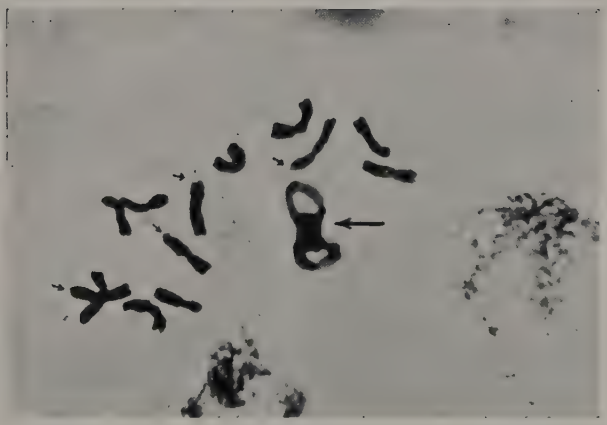


Foto. 1

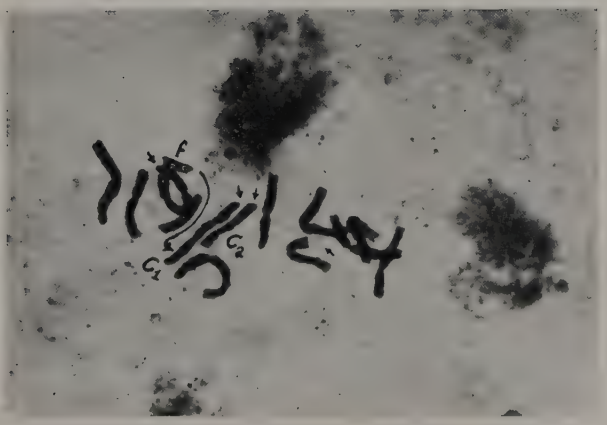


Foto. 2

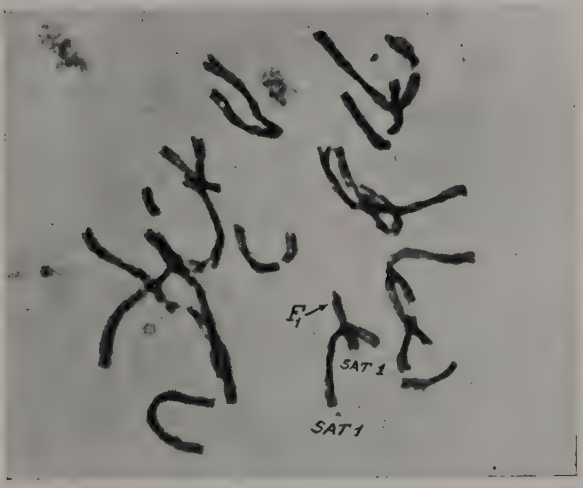


Foto. 3

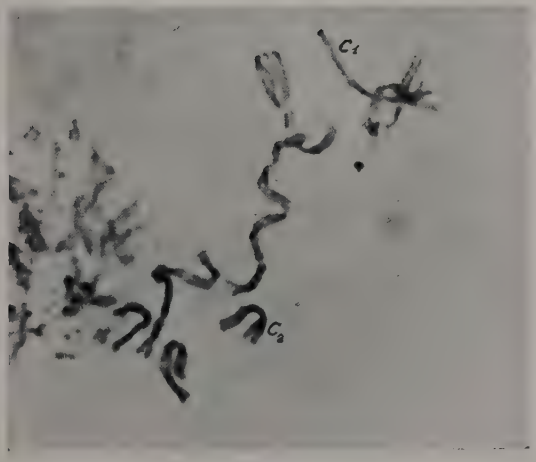


Foto. 4

VOLUME III — TOMO IV

DOZE ANOS DE CITOLOGIA E GENÉTICA DOS FUNGOS, por A. Quintanilha . . 241

MYCETES ALIQUOT LUSITANIAE-V, por Emmanuel de Sousa da Camara et Carlos Gomes da Luz 307

ÀCÊRCA DO VALOR TAXONÓMICO DO NÚMERO DE DENTES DA FÔLHA NA SEPARAÇÃO DE DOIS HÍBRIDOS DO GÉNERO *VITIS* L., por Acúrcio Rodrigues. . 325

O PROBLEMA DA FRAGMENTAÇÃO CROMOSÓMICA, OPERADA PELOS RAIOS X, ESTUDADA NO *TRITICUM MANOCOCCUM*, por A. Câmara . . . 341

ÍNDICE DO VOLUME III

NOTA SÔBRE OS PREJUÍZOS CAUSADOS PELO CICLONE DE 15 DE FEVEREIRO DE 1941 NOS AMENDOEIRAIS DO ALGARVE — J. Vieira Natividade . . . 5

NOTA SÔBRE O SISTEMA RADICULAR DA OLIVEIRA — J. Vieira Natividade . 15

MYCETES ALIQUOT LUSITANIAE-IV — Emmanuele de Sousa da Camara et Carlos Gomes da Luz 25

NOTA SÔBRE O *GLOEOSPORIUM OLIVARUM* ALM. — Raúl Vasco de Garcia Cabral 49

A DIAGNOSE DE DEFICIENCIAS NUTRITIVAS NA OLIVEIRA PELA INJECÇÃO DE SOLUÇÕES SALINAS — Francisco José de Almeida 59

INFECÇÕES PERENAIS DA *TRANSCHELIA PRUNI-SPINOSAE* PÉRS. NA *ANEMONE CORONARIA* — B. d'Oliveira e Maria de L. Vieira Borges 71

O SIGNIFICADO ECOLÓGICO E FISIOLÓGICO DO SISTEMA RADICULAR AÉREO DA OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.) E DA ALFARROBEIRA (*SERATONIA SILIQUA* L.) — J. Vieira Natividade 85

DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ESTÁGIOS LARVARES DA MOSCA DA AZEITONA — Alexandre José Duarte 93

ALGUMAS CONTAGENS DE CROMOSOMAS NO GÉNERO *ULEX* (SENSU LATU) — Duarte de Castro 103

UM VIRUS DAS LILIÁCEAS EM PORTUGAL — Maria de Lourdes d'Oliveira . . 115

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO E FRUTIFICAÇÃO DO *CORYNEUM LONGISTIPITATUM* BERL. ET BRES. — A. Cordeiro Zagallo 121

A *CYDIA POMONELLEA* L. E A SUA BIOLOGIA EM PORTUGAL — A. Rosa de Azevedo 129

A BEIRA TRANSMONTANA NA CARTA REGIONAL PORTUGUESA — J. de Pina Manique e Albuquerque 145

O FOTOPERIODISMO NA *SOJA HISPIDA* MOENCH — João Marques de Almeida 183

VARIAÇÕES DO RECORTE DA FÔLHA DA VIDEIRA — Acúrcio Rodrigues . 189

O «CROSSING-OVER» NOS MACHOS DA *DROSOPHILA MELANOGASTER* INDUZIDO PELOS RAIOS X — A. Câmara e Sarah de Vasconcellos. . 195

FORMAÇÃO DE CÉLULAS PULINUCLEADAS PELA ACÇÃO DA TRAUMATINA — Luís de Azevedo Coutinho. 209

A EXISTÊNCIA DO TCHERNOZEM EM PORTUGAL — Luis Bramão 215

SUBSÍDIOS PARA O ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO CLORETO DE SÓDIO NO TRIGO E NA CEVADA — por J. Contreiras 227

DOZE ANOS DE CITOLOGIA E GENÉTICA DOS FUNGOS — A. Quintanilha . 241

MYCETES ALIQUOT LUSITANIAE-V — Emmanuel de Sousa da Camara et Carlos Gomes da Luz 307

ÀCÊRCA DO VALOR TAXONÓMICO DO NÚMERO DE DENTES DA FÔLHA NA SEPARAÇÃO DE DOIS HÍBRIDOS DO GÉNERO *VITIS* L. — Acúrcio Rodrigues. 325

O PROBLEMA DA FRAGMENTAÇÃO CROMOSÓMICA, OPERADA PELOS RAIOS X, ESTUDADA NO *TRITICUM MANOCOCCUM* — A. Câmara. . . . 341